



# Biopuce à aptamères anti-thrombine : exploration d'une technique alternative de détection

Camille Daniel

## ► To cite this version:

Camille Daniel. Biopuce à aptamères anti-thrombine : exploration d'une technique alternative de détection. Autre. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT : 2013GRENY037 . tel-00954086

**HAL Id: tel-00954086**

**<https://theses.hal.science/tel-00954086>**

Submitted on 28 Feb 2014

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Physique pour les Sciences du Vivant**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Camille DANIEL**

Thèse dirigée par **Arnaud BUHOT**  
codirigée par **Yoann ROUPIOZ**

préparée au sein du **CEA Grenoble**  
**Institut Nanosciences et Cryogénie (INAC)**  
Service : **Structures et Propriétés d'Architectures Moléculaires (SPrAM)**  
Groupe : **Chimie pour la Reconnaissance et l'Etude des Assemblages**  
**Biologiques (CREAB)**  
dans l'**École Doctorale de Physique**

## **Biopuce à aptamères anti-thrombine** *exploration d'une technique alternative* *de détection*

Thèse soutenue publiquement le **21 Octobre 2013**  
devant le jury composé de :

**M. Eric PEYRIN**

Professeur à l'Université Joseph Fourier (Grenoble), Président

**Mme. Maryam TABRIZIAN**

Professeur à l'Université McGill (Canada), Rapporteur

**Mme. Maria MINUNNI**

Professeur à l'Université de Florence (Italie), Rapporteur

**Mme. Claude NOGUES**

Chargée de Recherche à l'ENS Cachan, Examineur

**M. Arnaud BUHOT**

Directeur de Recherche au CEA Grenoble, Directeur de Thèse

**M. Yoann ROUPIOZ**

Chargé de Recherche au CEA Grenoble, Co-Directeur de Thèse





# REMERCIEMENTS

J'aurais aimé pouvoir commencer ce manuscrit de thèse par les célèbres mots « Il était une fois... », car c'est, à mon sens, l'une des meilleures façons de bien commencer le récit d'une grande ou d'une petite aventure. Mais il est de bon ton, lorsque l'on est entrain de finaliser la dernière version de son manuscrit, de débiter en réalité par la fin : en remerciant chaleureusement toutes les personnes ayant contribué à l'aventure. Et peut être, après tout, est-ce finalement la manière la plus pertinente de le commencer. Car je reste absolument convaincue qu'aucune aventure n'existe sans toutes les personnes, nombreuses, qui la composent et qui lui donnent son sens. Je suis donc très heureuse de commencer ce manuscrit par un tout autre mot.

Merci. Merci à toutes celles et à tous ceux qui ont façonné ce qui aura été mes trois années de thèse à Grenoble, presque quatre si on leur ajoute les six mois de stage précédents. Une minuscule aventure sans doute, au regard de beaucoup d'autres qui se construisent chaque jour, mais une aventure gigantesque d'un point de vue tout personnel.

Je ne suis pas certaine de réussir maintenant l'exercice périlleux qui consiste à citer tous mes compagnons d'aventure sans en oublier un seul ; ces premiers mots s'adressent donc à toutes les personnes qui ont croisé mon chemin pour quelques minutes, quelques heures ou quelques années, et dont la curiosité en aurait été suffisamment éveillée pour qu'elles lisent à présent ces quelques lignes.

Quitte à commencer par la fin, je tiens maintenant à remercier sincèrement les membres de mon jury, qui ont accepté, avec un grand enthousiasme, de relire et de juger ce manuscrit et plus généralement mon travail de thèse : mes deux rapporteurs (–teuses –trices ?) tout d'abord, qui se sont déplacées de loin pour permettre cette rencontre internationale, les professeurs Maryam Tabrizian et Maria Minunni. Le professeur Eric Peyrin ensuite, Président de ce jury, ainsi que Madame Claude Noguès, examinatrice. Merci pour votre temps, que je sais précieux, votre intérêt évident, vos encouragements pour la suite et la pertinence de vos remarques.

Un merci tout particulier évidemment, aux deux derniers membres de mon jury, qui furent surtout bien plus que cela : mes deux directeurs de thèse, Arnaud Buhot et Yoann Roupioz. Jour après jour, vous avez été des encadrants formidables, d'une importance inestimable pour la conduite de ce projet et pour moi-même. Ce projet a d'abord commencé avec vous, et je suis très heureuse que vous ayez su me convaincre et me permettre de me l'approprier, sans jamais l'abandonner pour autant. Je n'ai pas eu l'occasion de douter, ni de votre soutien, ni de la pertinence de vos conseils et de votre vision, contre lesquels je crois n'avoir jamais eu besoin de m'élever. Cet appui subtil mais solide, tient sans aucun doute un énorme rôle dans ce que je considère comme la réussite de ce projet, tant d'un point de vue scientifique que personnel : à aucun moment je n'ai regretté avoir pris la décision de poursuivre cette aventure avec vous à la suite de mon stage, et aujourd'hui ne fait nullement exception. Je n'oublie pas les périodes plus difficiles que comporte nécessairement un projet exploratoire de plusieurs années, les zones de doute et les pertes ponctuelles de motivation ; je ne nie pas non plus la satisfaction que j'ai à présent à conclure ce projet pour, je l'espère, pouvoir aborder de nouvelles aventures probablement différentes. Mais tout cela n'efface en rien le plaisir que je tire de cette expérience passée en votre compagnie au CREAB, et la vague de nostalgie qui ne manque pas de m'envahir lorsque je pense à quitter cette grande famille (à laquelle, oui bien sûr, Arnaud appartient, par son statut de créabien d'adoption, qui vient s'ajouter à son statut de directeur du Groupe Théorie).

Je tiens également à remercier Didier Gasparutto, du SCIB, pour sa collaboration sur une partie de cette étude, ainsi que Ferial Mélaïne pour son travail sur la chimie de greffage thiol lors de son stage de Master 2 : ce fut un plaisir de te voir un temps sur ce projet, que tu n'as pas manqué de faire avancer de façon remarquable ! Ta poursuite en thèse au CREAB n'en fut que justifiée et, je l'espère, se terminera sur une belle réussite l'année prochaine.



Merci à Claudine Chaffy, pour m'avoir permis de découvrir un autre aspect passionnant du doctorat : celui de l'enseignement. Les TDs MAT128 m'ont replongé un temps dans un programme bien différent de celui de ma thèse, mais bien agréable à transmettre (ou du moins tenter plus ou moins adroitement de transmettre) à de nouvelles générations.

Dans un autre esprit, merci aussi à l'ensemble du SPram, notamment son ancien directeur Jean-Pierre Travers et les représentants au conseil UMR, avec qui j'ai beaucoup appris sur le fonctionnement d'un laboratoire, ainsi que son personnel administratif Catherine Pascal, Charles Picot et Céline Deval.

Merci surtout, à l'ensemble des membres qui composent cette grande famille du CREAB qui ne cesse de s'élargir (créabien un jour, créabien toujours !). Son directeur Thierry Livache, bien sûr, qui m'a tout de suite fait confiance en me permettant de réaliser mon stage dans son équipe et d'y rester par la suite, ainsi que tous les autres chercheurs permanents qui y travaillent : André Roger, Roberto Calemczuk, Loïc Leroy, Yanxia Hou-Brouin, Martial Billon, Aurélie Bouchet-Spinelli de façon plus récente (mais non moins importante) et, de façon (quasiment) révolue, Pascal Mailley. Vous représentez le cœur de ce laboratoire, une réelle source d'inspiration sur ce que peut, et devrait toujours, être une équipe pluridisciplinaire, diversifiée, joyeuse, soudée, performante, mais toujours accessible et incroyablement douée pour transmettre et faire perdurer cette ambiance caractéristique du CREAB, que nombre de laboratoires envient certainement.

Les techniciens du laboratoire vous y aident assurément, qu'il se soit agi de Sébastien Dumenil dans le passé ou de Raphael Mathey et José Galvez à présent. Vous incarnez également ce laboratoire, merci pour votre bonne humeur quotidienne, votre aide toujours délivrée avec le sourire et votre participation fréquente (et toujours enthousiaste) à nos sorties de non-permanents !

Les non-permanents, parlons-en. Un grand nombre d'entre vous à présent se sont succédé au cours des trois ans et demi que j'ai passés au laboratoire, en contribuant pour la plupart à faire de cette expérience, une expérience unique qui a largement dépassé le cercle professionnel. Je vous dois une grande part de mes joies à Grenoble ; de mes peines aussi lorsque l'heure des départs successifs sonnait. Heureusement, la relève m'a chaque fois démontré qu'il était possible, à défaut de vous remplacer, de combler un peu le vide que vous laissiez en partant. Après avoir partagé de bons restos ou de violentes batailles (au laser game) (que j'ai souvent perdues mmh...), des soirées, des cinés, des ragots, des randos, des premières expériences de snow et des journées de ski, des débats éthico-futuristiques, des conseils, des plateaux de fromage et des bouteilles de vin, des élections présidentielles, des barbecues, des concours et des cours de cuisine, un Ekiden, du covoiturage, des voyages, et parmi tout ça, quelques moments de Science aussi (qui s'apparentaient parfois à voir la mer pour la première fois...), j'espère continuer à avoir de vos nouvelles encore longtemps ! Merci à (dans le désordre et de façon non exhaustive) : Radek, Morgane, Diego, Laurent, Florian, Jie, Laure, Sandrine, Sami, Loïc, Feriel, Laurie, Cyril, Benjamin... Et mes meilleures pensées à celles qui sont arrivées plus récemment : Vanessa, Emilie, Diane, Stacie et Julia.

Je ne peux tout de même m'empêcher de réserver un merci un peu spécial (le genre qui serait crié du haut d'un sommet enneigé, sur un fond de musique un peu épique, si ces remerciements étaient filmés) à Maria, pour avoir accompagné l'immense majorité de ces moments évoqués et plus encore. Je ne saurais commencer à expliquer ici toutes les raisons pour lesquelles ta présence fut si importante au cours de cette thèse, alors simplement : merci d'avoir partagé sans réserve notre bureau, notre thèse et ton amitié.

Le laboratoire fut très important, mais je n'oublie pas tous ceux qui m'ont supportée à Grenoble en dehors du travail. Mes chers colocataires, passés et présents : Arnaud et Paolo, Nadège et Max. Quitter cet appartement, qui était devenu notre maison, ne sera pas une mince affaire, mais je compte bien sur une dernière réunion de notre fine équipe à cette occasion ! Mes presque colocataires : Lucie (fer), Nico, Rémy (Ed ?) et Christoph, qui m'ont offert (contre leur gré parfois peut être, ce n'est pas comme si je leur avais beaucoup laissé le choix) un deuxième chez-moi ; ainsi qu'à Carina, Diego, Gab et Aurélien, avec qui j'ai beaucoup apprécié pouvoir partager, à divers degrés, le rôle de squatteurs

officiels. D'autres personnes enfin, pour certaines non moins importantes : Olivier, Joni, Emilie, Antoine, Matthieu... Et malgré la distance : Oriane, Aude, Elie, Clo, Sophie, Marion, Joël, Quentin, Adrien, Anne-Laure, Anne-Claire...

Je sais que je n'ai pas fait dans la brièveté (et j'imagine que ça ne surprendra pas grand monde), mais j'aimerais occuper encore quelques lignes pour remercier ma famille. Principalement mes parents et mes sœurs, Pauline et Justine, pour leur présence, leur soutien et leur amour constant. Ce sont les principales fondations de mon monde et cette pensée a toujours l'immense pouvoir d'alléger mon cœur et d'éclaircir tous les chemins.

Guillaume enfin, pour toutes ces raisons évidentes qui me font espérer que notre aventure se poursuivra encore longtemps et en englobera beaucoup d'autres...

Il est temps pour moi de découvrir de nouveaux horizons, qui, sait-on jamais, rejoindront peut être à nouveau les vôtres... Bonne route ! Et,

Bisous, bisous.



# TABLE DES MATIERES

|  |           |
|--|-----------|
| <b>REMERCIEMENTS</b>   | <b>3</b>  |
| <b>TABLE DES MATIÈRES</b>  | <b>7</b>  |
| <b>TABLE DES ABRÉVIATIONS</b>  | <b>9</b>  |
| <b>1 INTRODUCTION GÉNÉRALE</b>   | <b>11</b> |
| 1.1 Biocapteurs et Biopuces .....  | 12        |
| 1.1.1 Invention et développement des biocapteurs et biopuces .....                   | 12        |
| 1.1.2 Un élément de reconnaissance alternatif : les aptamères .....                  | 16        |
| 1.1.3 Un élément transducteur intéressant : la SPRi .....                            | 21        |
| 1.2 Détecter la thrombine .....  | 27        |
| 1.2.1 La coagulation sanguine .....  | 28        |
| 1.2.2 La thrombine : ses rôles et sa structure .....                                 | 31        |
| 1.2.3 Les aptamères anti-thrombine (APT1 et APT2) .....                              | 33        |
| 1.2.4 Utilisation des aptamères APT1 et APT2 pour la détection de la thrombine ..... | 35        |
| 1.3 Objectifs de la thèse .....  | 38        |
| <b>2 FABRICATION ET CARACTÉRISATION DES BIOPUCES</b>                                 | <b>41</b> |
| 2.1 Etat de l'art de la détection de la thrombine par SPR .....                      | 42        |
| 2.2 Elaboration de la puce et protocole de détection par SPRi .....                  | 46        |
| 2.2.1 Design de la puce .....  | 46        |
| 2.2.2 Montage SPRi et protocole général de détection .....                           | 53        |
| 2.2.3 Optimisation du blocage de la puce .....                                       | 58        |
| 2.3 Performances des biopuces .....  | 60        |
| 2.3.1 Détection classique et gamme de concentration .....                            | 60        |
| 2.3.2 Détection cinétique et courbe d'étalonnage .....                               | 63        |
| 2.3.3 Avantages et performances .....  | 64        |
| 2.4 Détermination des $K_D$ .....  | 66        |
| 2.4.1 Définition et détermination du $K_D$ .....                                     | 66        |
| 2.4.2 Le $K_D$ de surface .....  | 68        |
| 2.4.3 Le $K_D$ en solution .....   | 71        |
| 2.4.4 Discussion sur $K_D^{\text{surf}}$ vs $K_D^{\text{sol}}$ .....                 | 74        |
| 2.5 Conclusion .....   | 75        |
| <b>3 FORMATION DU COMPLEXE « SANDWICH » DE LA THROMBINE AVEC SES DEUX APTAMÈRES</b>  | <b>77</b> |

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| 3.1      | Introduction .....  | 77         |
| 3.2      | Formation du sandwich et amplification du signal.....                     | 79         |
| 3.2.1    | Choix des sondes et protocoles de détection .....                         | 79         |
| 3.2.2    | Formation séquentielle du sandwich.....                                   | 81         |
| 3.2.3    | Formation du sandwich par co-injections .....                             | 84         |
| 3.2.4    | Quantification du nombre de complexes formés sur la puce .....            | 86         |
| 3.3      | Sélectivité des aptamères pour les exosites de la thrombine .....         | 88         |
| 3.4      | Choix d'un bon protocole d'amplification .....                            | 89         |
| 3.5      | Détermination d'un effet allostérique inter-exosite .....                 | 93         |
| 3.5.1    | Etude bibliographique.....  | 93         |
| 3.5.2    | Résultats des expériences « sandwich » .....                              | 96         |
| 3.6      | Conclusion.....   | 98         |
| <b>4</b> | <b>VERS UNE ETUDE DES INTERACTIONS NATURELLES DE LA THROMBINE</b>         | <b>101</b> |
| 4.1      | Des inhibiteurs naturels de la thrombine .....                            | 102        |
| 4.1.1    | Le mécanisme d'inhibition de la thrombine .....                           | 102        |
| 4.1.2    | Conditions expérimentales.....  | 105        |
| 4.1.3    | Etude de l'interaction thrombine-antithrombine III-héparine.....          | 106        |
| 4.1.4    | Etude de l'interaction thrombine-cofacteur II de l'héparine-héparine..... | 109        |
| 4.2      | La transformation de la prothrombine .....                                | 111        |
| 4.2.1    | Le mécanisme de formation de la thrombine.....                            | 111        |
| 4.2.2    | Conditions expérimentales.....  | 112        |
| 4.2.3    | Détection et transformation de la prothrombine .....                      | 113        |
| 4.2.4    | Etude des conditions de formation de la thrombine.....                    | 116        |
| 4.3      | Conclusion.....   | 121        |
| <b>5</b> | <b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>  | <b>125</b> |
|          | <b>BIBLIOGRAPHIE</b>  | <b>133</b> |
|          | <b>ANNEXE A. MATÉRIEL EXPÉRIMENTAL</b>                                    | <b>149</b> |
|          | <b>ANNEXE B. PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX</b>                                 | <b>151</b> |
|          | <b>ANNEXE C. TRAITEMENT DES DONNÉES</b>                                   | <b>155</b> |
|          | <b>ANNEXE D. FORMATION DU COMPLEXE « SANDWICH »</b>                       | <b>157</b> |

# TABLE DES ABREVIATIONS

|                |  |
|----------------|--|
| A              | Adénine, base d'ADN  |
| ABE            | <i>Anion-Binding Exosite (En.)</i>   |
| ADN            | Acide DésoxyriboNucléique  |
| ADN-bio        | Séquence d'ADN biotinylée  |
| ADNc           | Séquence d'ADN complémentaire  |
| APT            | Aptamère   |
| ARN            | Acide RiboNucléique  |
| ATIII          | Antithrombine III, inhibiteur de la thrombine  |
| Au             | Or   |
| bio            | Biotine  |
| BSA            | Albumine sérique bovine / <i>Bovine Serum Albumin (En.)</i>  |
| BSI            | Interférométrie rétrodiffusée / <i>Back-Scattering Interferometry (En.)</i>                        |
| C              | Cytosine, base d'ADN   |
| CCD            | Dispositif à transfert de charge (capteur photographique) / <i>Charge-Coupled Device (En.)</i>     |
| CEA            | Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives                                     |
| CNRS           | Centre National de la Recherche Scientifique   |
| CREAB          | Chimie pour la Reconnaissance et l'Etudes des Assemblages Biologiques                              |
| cyt c          | Cytochrome c   |
| Da             | Dalton   |
| FDA            | <i>Food and Drug Administration (En.)</i>  |
| FRET           | Transfert d'Energie par Résonance de type Förster / <i>Förster Resonance Energy Transfer (En.)</i> |
| FVa            | Facteur Va de la coagulation   |
| FXa            | Facteur Xa de la coagulation   |
| G              | Guanine, base d'ADN  |
| HCII           | Cofacteur II de l'héparine, inhibiteur de la thrombine / <i>Heparine Cofactor II (En.)</i>         |
| Hep            | Héparine   |
| IFN- $\gamma$  | Interféron gamma   |
| ITC            | Titration calorimétrique isotherme / <i>Isothermal Titration Calorimetry (En.)</i>                 |
| K <sub>D</sub> | Constante de dissociation à l'équilibre  |
| kDa            | Unité de mesure kiloDalton   |
| LAN            | Laboratoire Lésion des Acides Nucléiques   |
| LED            | Diode électroluminescente / <i>Light-Emitting Diode (En.)</i>                                      |
| NHS            | N-Hydroxysuccinimide   |
| NP             | Nanoparticule  |

|            |   |
|------------|---|
| PCR        | Réaction en chaîne par polymérase / <i>Polymerase Chain Reaction (En.)</i>                    |
| PEEK       | Plastique polyétheréthercétone  |
| PEG        | Polyéthylène glycol   |
| PL         | Phospholipides  |
| Ppy        | Polypyrrole   |
| proTHR     | Prothrombine  |
| QCM        | Microbalance à quartz / <i>Quartz Cristal Microbalance (En.)</i>                              |
| SA         | Streptavidine   |
| SAM        | Monocouche auto-assemblée / <i>Self-Assembled Monolayer (En.)</i>                             |
| SCIB       | Service de Chimie Inorganique et Biologique   |
| SELEX      | <i>Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (En.)</i>                        |
| SPR        | Résonance plasmonique de surface / <i>Surface Plasmon Resonance (En.)</i>                     |
| SPrAM      | Structure et Propriétés d'Architectures Moléculaires  |
| SPRi       | Imagerie de résonance plasmonique de surface / <i>Surface Plasmon Resonance imaging (En.)</i> |
| T          | Thymine, base d'ADN   |
| TE         | Polarisation Transverse Electrique  |
| THR        | Thrombine   |
| TM         | Polarisation Transverse Magnétique  |
| U.S.P      | Unité de mesure <i>United States Pharmacopeia (En.)</i>                                       |
| $\Delta R$ | Variation de réflectivité   |
| [X]        | Concentration du produit X  |

# 1

## INTRODUCTION GENERALE

*De l'invention des biocapteurs à l'utilisation d'aptamères pour la détection de la thrombine*

*Si vous pouvez mesurer ce dont vous parlez, et l'exprimer par un nombre, alors vous connaissez quelque chose de votre sujet. Si vous ne le pouvez, votre connaissance est d'une bien pauvre espèce et bien incertaine.*

— William Thomson (1824-1907), plus connu en tant que Lord Kelvin

Pour analyser tout phénomène physique, chimique, biologique, médical, sociologique... il faut le quantifier et donc le mesurer. La mesure est le fondement de toute activité scientifique, pour comparer, justifier, suivre des phénomènes.

Aujourd'hui nous sommes arrivés au paroxysme de cette approche avec une multiplication extraordinaire des données mesurées ayant largement débordé la sphère scientifique pour envahir tous les domaines et les rendre accessibles partout, tout le temps, notamment grâce au développement d'outils toujours plus performants de collecte et de diffusion. Plus que jamais nous mesurons aujourd'hui le monde.

A la base de la mesure réside un outil primordial à la collecte de l'information : le capteur. Avant l'invention des premiers instruments de mesure, l'Homme interagissait et analysait déjà le monde extérieur grâce aux informations transmises *via* ses organes sensoriels. Ces derniers sont finalement les premiers capteurs intégrés à notre corps qui nous permettent de détecter ce à quoi nous sommes sensibles : les êtres vivants possèdent en général une certaine sensibilité chimique (*via* l'olfaction et la gustation), lumineuse (*via* la vision) et mécanique (*via* l'audition et le toucher). Cependant notre sensibilité est limitée. En effet, une multitude de



stimulations chimiques, physiques et biologiques se déversent constamment sur notre organisme, sans que nous en ayons conscience et sans que nous les détectons. Nous sommes insensibles à de nombreuses et infimes stimulations chimiques et biologiques (gaz inodores, attaques virales ou bactériennes), aux rayonnements électromagnétiques très longs (ondes hertziennes) ou très courts (rayons gamma ou cosmiques) et aux radiations lumineuses infrarouges ou ultraviolets, aux vibrations ultrasoniques et infrasoniques. L'information fournie par nos organes sensoriels est donc incomplète et incertaine. De puissance limitée, elle ne nous donne qu'une connaissance très partielle du réel. Parce que toutes ces stimulations ont des conséquences parfois cruciales sur le fonctionnement de nos organismes et représentent une source gigantesque d'informations pour mieux comprendre le monde qui nous entoure et devenir acteur de celui-ci, l'Homme a très vite cherché à développer des capteurs spéciaux pour les observer.

Un capteur peut être défini comme une interface entre un processus physique et une information manipulable par l'homme. Du plus simple et plus répandu (une balance, un thermomètre...) au plus complexe, leur nombre s'est multiplié au fur et à mesure des avancées de la Science pour en faire des outils toujours plus précis et fiables, et mesurer toujours plus de grandeurs physiques. Il en existe aujourd'hui de toute sorte, de toute taille, de toute complexité et pour toute sorte d'application. La grande catégorie dans laquelle s'inscrit tout le travail présenté ici est celle, relativement récente, des biocapteurs.

Le présent chapitre a pour but de présenter les différents éléments qui conduisent naturellement aux objectifs de cette thèse. Il est basé sur deux axes : le premier est celui de la présentation des biocapteurs. En partant du contexte général, nous nous dirigerons vers le type de biocapteur que nous nous proposons de réaliser, tirant parti, à la fois des avantages de l'élément de reconnaissance choisi, et de l'élément de transduction du signal utilisé. Le deuxième axe porte sur la biomolécule que nous nous proposons d'étudier, la thrombine, et les différentes façons de la détecter. Le chapitre se conclut sur les objectifs de la thèse, dont les résultats feront l'objet des quatre chapitres suivants.

## ***1.1 Biocapteurs et Biopuces***

### **1.1.1 Invention et développement des biocapteurs et biopuces**

Les biocapteurs constituent une grande classe de capteurs relativement récente en regard de l'histoire des capteurs. Cela est dû au fait qu'ils sont basés sur des réactions et/ou des éléments de nature biologique, et donc des phénomènes et des objets dont la connaissance, sans parler de la compréhension, a dû attendre des avancées technologiques et scientifiques très importantes. Les objets dont nous parlons sont situés dans des échelles de mesure (en taille et en masse) longtemps restées inaccessibles à l'observation par l'Homme. La biochimie toute entière est un domaine de recherche très jeune qui n'a pu émerger qu'à partir du XIX<sup>ème</sup>

siècle, lorsque la synthèse chimique de l'urée par Friedrich Wöhler (1800-1882) a commencé à ébranler la notion de vitalisme, selon laquelle la chimie des êtres vivants serait une chimie spécifique, non reproductible en dehors du Vivant (Ramberg 2000). Le domaine va ensuite s'enrichir et progresser à pas de géant au fur et à mesure de l'apparition de techniques nouvelles (la chromatographie au début des années 1900 (Tswett 1906), l'électrophorèse dans les années 1930 (Tiselius 1937), etc.) pour faire évoluer notre conception du vivant et de son fonctionnement. N'oublions pas que la structure aujourd'hui très célèbre et bien connue de l'ADN en double hélice<sup>1</sup> n'a été élucidée qu'en 1953, grâce en particulier aux travaux pionniers de Rosalind Franklin, Maurice Wilkins, James Watson et Francis Crick et à la technique de diffraction des rayons X (Franklin 1953; Watson 1953; Wilkins 1953) !

Peu étonnant donc que le premier biocapteur officiel ait à peine 50 ans. On le doit à Leland Clark lorsqu'il imagina en 1962 la première électrode à glucose (Clark 1962). Aujourd'hui la définition d'un biocapteur reste un peu floue et peut être plus ou moins restrictive selon les contextes. La version la plus large, donnée par l'IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) est la suivante (Nagel 1992) :

*A device that uses specific biochemical reactions mediated by isolated enzymes, immunosystems, tissues, organelles or whole cells to detect chemical compounds usually by electrical, thermal or optical signals.*

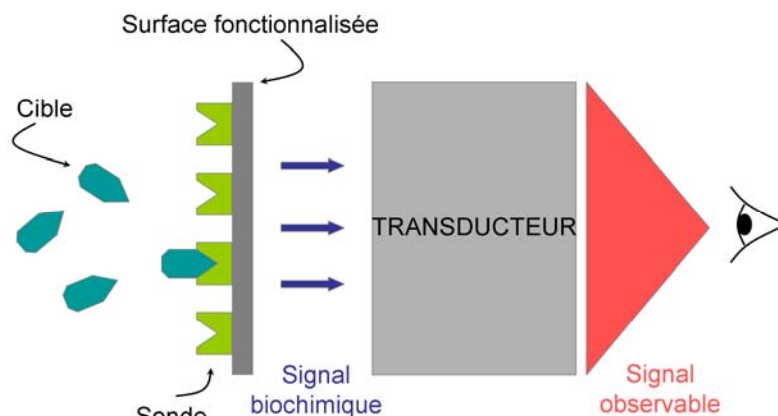
Qui peut se traduire par :

*Un dispositif qui utilise des réactions biochimiques spécifiques induites par des enzymes isolées, des éléments du système immunitaires, des tissus, des organelles ou des cellules entières pour détecter des composés chimiques, généralement par le biais de signaux électriques, thermiques ou optiques.*

En pratique, on le définit souvent plus simplement par l'association de deux éléments (**Figure 1.1**) :

- D'une part il doit comporter un élément de reconnaissance biologique, ou sonde (qui peut être par exemple : des anticorps, de l'ADN, des protéines, des enzymes, des cellules...)
- D'autre part, cet élément de reconnaissance doit être associé à un transducteur, qui transforme la réaction de reconnaissance (formation du complexe sonde-cible entre la sonde choisie et la cible à détecter) en un signal physique mesurable et quantifiable (électrique, thermique, optique ou mécanique).

<sup>1</sup> Voir p.16 pour une définition de la structure de l'ADN et Figure 1.3 pour la représentation de la double hélice.



**Figure 1.1** Schéma de principe d'un biocapteur

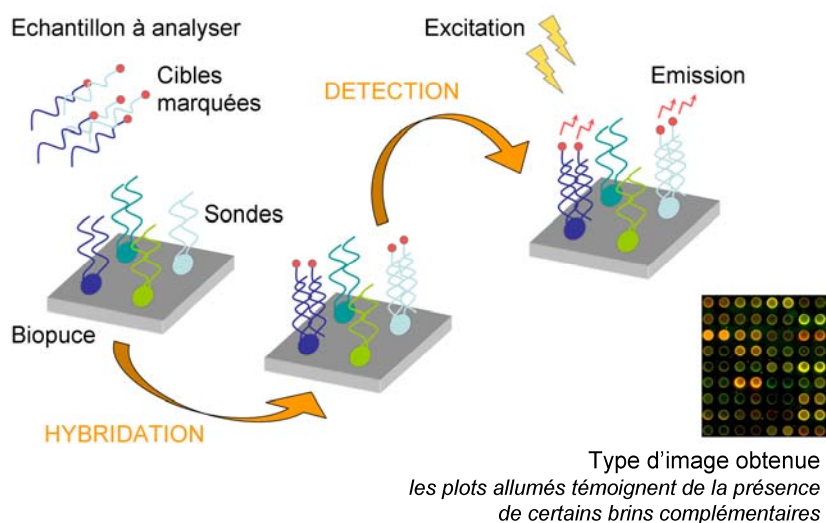
Ces dernières années, le domaine des biocapteurs a connu un développement tout à fait remarquable. Celui-ci est le résultat de plusieurs facteurs dont l'un des principaux est le besoin très vif en capteurs fiables qu'entraîne la croissante sévérité des normes dans tous les domaines touchant à la chimie et la biochimie appliquée (environnement, alimentation, pharmacie, sécurité domestique et industrielle, suivi médical...). Un deuxième facteur est le besoin d'outils toujours plus perfectionnés, rapides, simples d'utilisation et adaptés à l'étude de réactions biochimiques pour mieux les comprendre, les analyser et diagnostiquer des dysfonctionnements éventuels.

On comprend donc aisément que les grands domaines d'application des biocapteurs comprennent le domaine biomédical et pharmaceutique, l'analyse des aliments, la qualité de l'environnement, le bioterrorisme et, de manière plus surprenante et plus récente, le domaine spatial (avec notamment la recherche de la vie sur Mars (Skelley 2005)).

Dans cette grande diversité de biocapteurs, on distingue régulièrement le cas particulier du format des biopuces. Une biopuce peut être définie comme l'assemblage de plusieurs éléments de reconnaissance différents, organisés sur une même surface microstructurée mesurant typiquement quelques  $\text{cm}^2$  ou moins, dans le but de paralléliser, automatiser et miniaturiser la détection de réactions biochimiques. Couplée à un transducteur, une biopuce permet ainsi la détection spécifique simultanée de plusieurs cibles, et peut donc être vue comme l'association de plusieurs biocapteurs sur un même objet permettant une analyse complexe d'un échantillon unique.

Historiquement, même si la première biopuce conçue en 1989 fut une biopuce à protéines (Ekins 1989), les biopuces furent rapidement développées pour l'analyse d'échantillons d'ADN/ARN et permirent, entre autre, des études directes et qualitatives de transcriptomes, c'est à dire de l'ensemble du matériel génétique exprimé dans une cellule donnée (Gershon 2002). Aujourd'hui encore les biopuces à ADN sont les plus développées et commercialisées. La plupart reposent toujours sur une détection optique par fluorescence. Des brins d'ADN sont fixés sur un support solide (typiquement du verre) et l'ADN ou l'ARN cible complémentaire qu'on souhaite analyser/séquencer est marqué avec un fluorophore.

L'hybridation du brin cible sur la puce est détectée, après des opérations de lavage et séchage de la puce, grâce au signal de fluorescence émis par ce fluorophore (**Figure 1.2**).



**Figure 1.2** Principe de détection par fluorescence des biopuces à ADN

Cependant les biopuces à protéines sont autrement plus délicates à mettre au point. Les protéines sont beaucoup moins simples à manipuler que les brins d'ADN utilisés dans les puces à ADN ; d'une part à cause de leur grande variabilité (de structure, de taille, de séquence), d'autre part à cause de leur très grande sensibilité aux conditions du milieu dans lequel elles sont (pH, salinité, température, etc.) qui peuvent être responsables d'une perte de leur activité biologique voire complètement inhiber l'interaction sonde-cible. Enfin, contrairement aux biopuces à ADN, la plupart des biopuces à protéines doivent être conservées en solution afin de maintenir l'activité enzymatique ou de reconnaissance des protéines immobilisées.

L'élément de reconnaissance le plus largement utilisé pour la détection de protéine est issu du système immunitaire vivant. Ce sont des éléments qui permettent naturellement à notre corps de reconnaître toute intrusion extérieure et de déclencher en conséquence une réponse immunitaire appropriée : les anticorps. Cependant l'utilisation d'anticorps montre quelques difficultés à s'adapter au format des biopuces et à la détection multiple de différentes protéines sur une même surface. Les anticorps étant eux-mêmes des protéines, ils présentent tous les inconvénients déjà énoncés. De plus ils sont également très coûteux à obtenir car non synthétisables chimiquement. Une alternative aux anticorps est donc souhaitable pour l'étude et la détection de protéines sur biopuces.

### 1.1.2 Un élément de reconnaissance alternatif : les aptamères

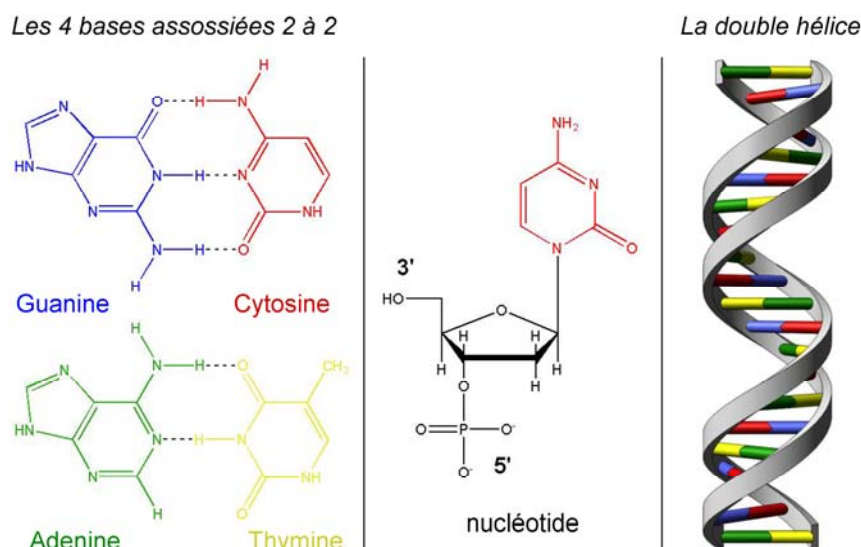
#### *Des acides nucléiques aux aptamères*

Tous les êtres vivants sont composés de cellules, capable de grandir et de se multiplier. Ces cellules sont elles-mêmes composées de plusieurs molécules. Les plus grosses sont des polymères, appelées macromolécules, et sont synthétisées à partir de petites sous-unités (monomères) : ainsi l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) et l'ARN (Acide RiboNucléique) sont formés de nucléotides, et les protéines sont un enchaînement d'acides aminés (Lewin 1990).

Ces molécules interagissent entre elles et sont responsables de la transmission de l'information génétique. L'ADN et l'ARN sont les supports de cette information alors que les protéines en sont l'expression. Chaque fois, c'est l'assemblage particulier des sous-unités (nucléotides et acides aminés) qui confère à la macromolécule ses propriétés. Ainsi à partir d'un nombre limité de formes de ces sous-unités (4 nucléotides différents pour l'ARN et l'ADN, 20 acides aminés pour les protéines), il est possible d'engendrer une grande diversité de macromolécules, servant à assurer une grande part des fonctions nécessaires à la vie des organismes.

Les nucléotides sont composés de trois éléments : un groupe phosphate, un sucre (le 2-désoxyribose dans le cas de l'ADN ou le ribose dans le cas de l'ARN, correspondant au remplacement d'un atome H par un groupe OH) et une base azotée. C'est la base azotée qui assure la variabilité de l'ADN et de l'ARN, puisqu'il en existe quatre différentes dans les deux cas, appelées cytosine (C), guanine (G), adénine (A) et thymine (T) dans le cas de l'ADN (**Figure 1.3**), cette dernière étant remplacée par l'uracile (U) dans le cas de l'ARN.

Une base azotée associée à un sucre forme un nucléoside, et ce nucléoside associé à un ou plusieurs phosphates forme un nucléotide. Les nucléotides sont reliés entre eux par des liaisons covalentes entre le sucre et le groupe phosphate qu'on appelle liaisons 5'-3' phosphodiester. De plus, comme les quatre bases sont complémentaires deux à deux, les bases puriques (A et G) s'associant aux bases pyrimidiques (respectivement T/U et C), l'ADN est formé, sous sa forme la plus stable, de deux brins complémentaires prenant la forme reconnaissable de double hélice (**Figure 1.3**).



**Figure 1.3** Structure de l'ADN, d'après (Maillard 2004). A gauche : les bases puriques (guanine et adénine) associées aux bases pyrimidiques (respectivement cytosine et thymine) *via* des liaisons hydrogène représentées en pointillés. Au centre : exemple de nucléotide composé d'un groupement phosphate, d'un sucre désoxyribose et d'une base (ici la cytosine en rouge). A droite : Structure classique double brin en double hélice de l'ADN.

L'ARN, du fait de la présence du groupe OH sur le sucre ribose, est chimiquement moins stable que l'ADN et se trouve le plus souvent dans la cellule sous forme de simple brin. Il possède, de la même manière que les protéines, une structure secondaire et tertiaire d'autant plus complexe, formée de zones appariées, de boucles terminales ou internes, d'hernies, etc. On lui reconnaît ainsi une activité et une capacité d'interaction avec les autres éléments de la cellule plus importantes que l'ADN. Au contraire, on ne considère souvent l'ADN que sous sa forme très stable de double brin, et pour ses trois fonctions essentielles dans la cellule : stocker l'information génétique, assurer l'hérédité et permettre l'évolution. Cependant, l'ADN sous sa forme simple brin peut également adopter un repliement complexe, lui attribuant d'autres propriétés tout aussi intéressantes. Les aptamères par exemple, peuvent ainsi tout aussi bien être formés à partir d'ARN que d'ADN simple brin.

### Découverte et sélection des aptamères

Les aptamères sont de petites séquences synthétiques d'oligonucléotides (ARN, ADN ou nucléotides modifiés) relativement courtes (de 15 à 60 bases) qui possèdent une excellente affinité et spécificité pour une molécule parmi une grande variété d'objets : médicaments, peptides, protéines, voire même cellules entières, bactéries ou virus. Leur découverte est relativement récente : c'est en 1990 qu'est inventé le concept d'aptamère, néologisme formé sur le latin *aptus* (apte à, approprié à, ou qui se lie à, qui joint) et le suffixe mère (unité de base composant un polymère), terme employé pour la première fois par Ellington et Szostak (Ellington 1990). Leur découverte est en réalité concomitante à la mise au point de la technologie SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*) qui est la technique utilisée pour sélectionner ces séquences d'oligonucléotides (Tuerk 1990).

Plus précisément, la méthode SELEX est le nom donné à la méthode combinatoire qui permet de sélectionner des aptamères pour une cible choisie. Comme toute méthode combinatoire, elle repose sur trois points essentiels : la synthèse d'une banque suffisante de composés à partir de laquelle seront sélectionnés les meilleurs candidats, le criblage de ces candidats qui permet de les sélectionner en fonction des propriétés recherchées (ici il s'agit de l'affinité pour la cible choisie), et enfin l'identification des candidats retenus. L'utilisation d'oligonucléotides comme candidats facilite grandement ces trois points et fait de la méthode SELEX une méthode très efficace, du fait de la nature même de ces molécules et des avancées réalisées depuis 30 ans en biologie moléculaire.

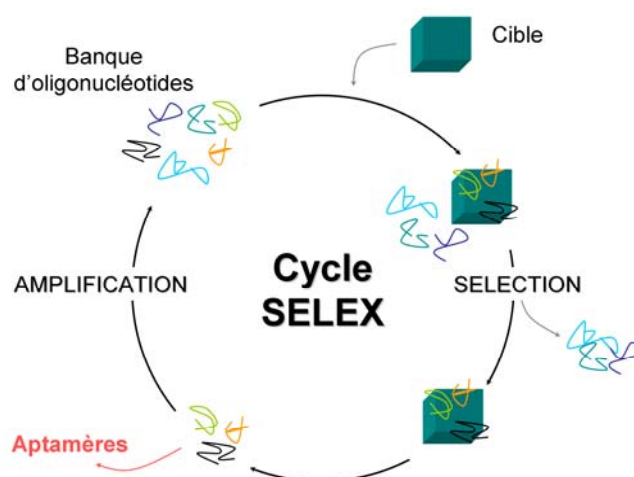
En effet, concernant le premier point, les progrès en matière de synthèse d'acides nucléiques sur support solide permettent de construire une banque de molécules pouvant contenir jusqu'à  $10^{15}$  composés différents. Ces composés sont des séquences d'ADN synthétisées chimiquement et comportant chacune une région variable de  $n$  nucléotides ainsi que deux régions fixes en 3' et 5', communes à tous les candidats et nécessaires à la phase de criblage.

La diversité de la banque de molécules dépend de la taille de la région variable  $n$  : elle vaut  $4^n$  étant donné que chaque position peut être occupée par l'un des quatre nucléotides A, T, C ou G. La limite expérimentale de l'importance de la banque se situe autour de  $10^{15}$  composés, ce qui correspond à une banque où la taille de la séquence variable  $n$  est de 25 nucléotides et où tous les candidats sont représentés, ou encore à une banque où  $n$  est égal à 30 mais où 1/1000 seulement des possibilités est exploré, ce qui reste généralement acceptable pour sélectionner des aptamères possédant les propriétés voulues (Toulme 2007).

Concernant la phase de criblage, la sélection s'opère par séparation physique entre molécules associées à la cible et molécules libres. Il existe pour cela de multiples techniques (chromatographie, rétention sur filtre, électrophorèse...). L'énorme avantage de l'utilisation d'oligonucléotides repose ensuite sur la mise au point en 1986, par Kary Mullis, de la réaction en chaîne par polymérase (PCR) (Mullis 1986) et sur tous les travaux qui ont suivi et qui ont abouti à la mise en place de la technique PCR de réplique ciblée *in vitro*, permettant d'amplifier des échantillons d'ADN spécifiques. Cette technique est basée sur l'utilisation d'amorces d'ADN complémentaires aux extrémités de la séquence d'ADN que l'on souhaite amplifier, et sur l'intervention d'une enzyme ADN polymérase qui synthétise, en incorporant des nucléotides triphosphates, le brin complémentaire de l'ADN matrice encadré par les deux amorces.

Dans le cas de la méthode SELEX, cette technique est employée à la fin de chaque cycle de criblage, de manière à amplifier les oligonucléotides sélectionnés, grâce à la connaissance des séquences correspondant aux régions fixes situées en 5' et 3'. Une fois amplifiés, ces oligonucléotides forment une nouvelle banque « enrichie » pouvant à nouveau être criblée. Il est ainsi possible de répéter l'opération autant de fois que nécessaire en réalisant plusieurs cycles de sélection, ce qui permet d'obtenir une population enrichie en séquences d'ADN affines pour la cible (**Figure 1.4**).

Le deuxième avantage de cette technique d'amplification PCR pour la méthode SELEX repose sur l'infidélité de la polymérase utilisée, qui est capable d'introduire quelques erreurs dans la copie de la séquence matrice. Loin d'être un inconvénient, cela permet d'augmenter légèrement la diversité de la banque initiale, en modifiant un candidat sur 100 environ à chaque cycle d'amplification (Toulme 2007).



**Figure 1.4** Principe de la méthode SELEX. Chaque cycle de sélection est composé d'une étape de mise en contact de la cible avec la banque d'oligonucléotides, une étape de sélection des séquences ayant présenté une affinité pour la cible et une étape d'amplification des séquences sélectionnées.

Enfin, seules les molécules les plus aptes sont sélectionnées et il ne reste plus que quelques unités, dizaines ou centaines de membres de la banque au bout de quelques cycles. Les séquences peuvent alors être clonées et séquencées avec les techniques classiques de génie génétique, ce qui permet d'identifier individuellement les aptamères, de les comparer et éventuellement d'en déduire des motifs structuraux critiques pour la propriété aptamère.

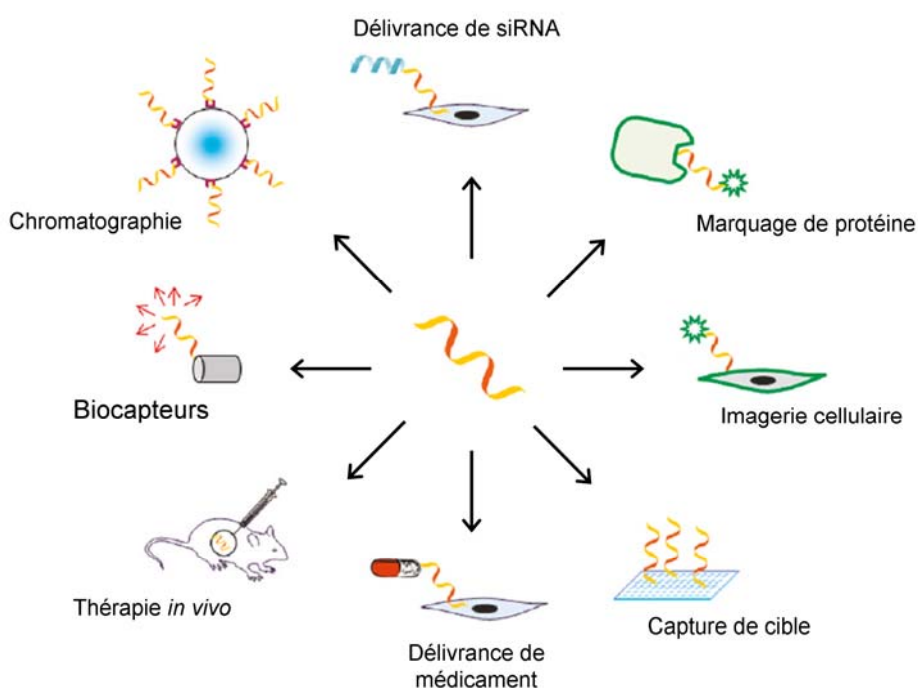
Il faut néanmoins retenir que le résultat de cette méthode dépend fortement des paramètres de sélection : par exemple de la concentration ionique du tampon utilisé, de la température, du temps d'incubation, des conditions de lavage, de la concentration relative des candidats et de la cible, de la présence de compétiteurs non amplifiables, etc. L'affinité des aptamères sélectionnés peut varier lors de leur utilisation ultérieure dans d'autres conditions expérimentales.

### *Application des aptamères*

Cette technique a ouvert la voie à de nombreuses applications (**Figure 1.5**), notamment dans le domaine de l'analyse médicale (diagnostic, purification, dosage, etc.) (Luzi 2003; Tombelli 2005) voire thérapeutique si l'aptamère présente, en plus de ses propriétés affines et spécifiques, une propriété inhibitrice pour sa cible protéique. Un aptamère dirigé contre le facteur d'angiogenèse (ou néovascularisation) VEGF a par exemple déjà obtenu l'approbation de la FDA (*Food and Drugs Administration*) aux Etats-Unis, en 2004, pour traiter la

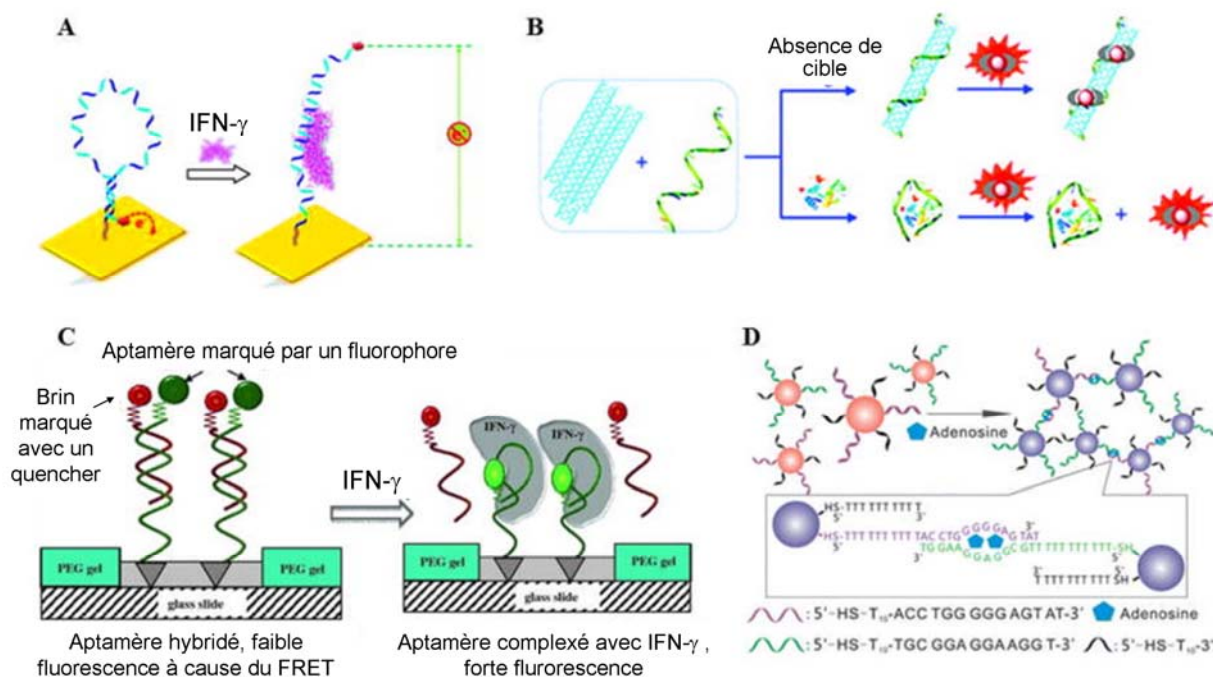


dégénérescence maculaire liée à l'âge, première cause de malvoyance dans les pays industrialisés (Macugen).



**Figure 1.5** Illustration des différentes applications possibles des aptamères dans le domaine de la biologie et biochimie, d'après (Iliuk 2011)

Plus précisément, les caractéristiques chimiques et la méthode de production des aptamères en font d'excellents éléments de reconnaissance, utilisables comme sondes dans les biocapteurs. Ces biocapteurs (parfois appelés « aptasensors ») exploitent alors les nombreux avantages de ces molécules : elles sont de petite taille, stables chimiquement dans le cas des aptamères ADN, et flexibles. Elles peuvent être facilement modifiées, afin par exemple d'incorporer des molécules marqueurs ou de favoriser leur immobilisation sur support solide, elles peuvent être produites et utilisées sous des conditions non physiologiques et leur synthèse est bien maîtrisée et peu coûteuse. Les sensibilités de ces biocapteurs dépendent énormément du mode de transduction choisi mais d'excellents résultats ont déjà été obtenus pour un très grand nombre de transducteurs utilisés en conjugaison avec des aptamères (Liu 2009a; Iliuk 2011), et pour une grande variété d'applications : analyse de l'environnement et de la nourriture, détection d'agents pathogènes dans le cadre d'attaques bioterroristes, diagnostic médical (Tombelli 2007). Un exemple de différentes technologies de biocapteurs à base d'aptamères est présenté **Figure 1.6**.



**Figure 1.6** Exemples d'utilisation des aptamères dans les biocapteurs, d'après (Iliuk 2011). **(A)** Représentation d'un biocapteur électrochimique, issue de (Liu 2010). Un aptamère replié en structure tige-boucle et fonctionnalisé avec un marqueur redox est greffé sur une électrode d'or, positionnant le marqueur redox proche de la surface de l'électrode. L'ajout de la cible (ici : l'interféron gamma IFN- $\gamma$ ) provoque un changement de structure et un éloignement du marqueur redox se traduisant par une plus faible efficacité de transfert d'électron. **(B)** Représentation d'un biocapteur luminescent, issue de (Ouyang 2010). En absence de la cible, les nanotubes de carbone sont liés aux aptamères provoquant un phénomène de « quenching » (extinction) qui éteint le signal de luminescence provenant d'ions  $\text{Eu}^{3+}$  présents en solution. Après l'ajout de la cible (ici : le lysosyme LYS), qui se lie avec l'aptamère, les nanotubes s'agrègent et peuvent facilement être séparés de l'échantillon provoquant un fort retour du signal de luminescence. **(C)** Représentation d'un biocapteur basé sur l'extinction du signal de fluorescence, issue de (Tuleuova 2010). Un aptamère marqué avec un fluorophore et un brin complémentaire marqué avec un désactivateur sont immobilisés dans un puit. Avant la détection de la cible (ici : IFN- $\gamma$ ), le signal de fluorescence est éteint par le FRET (Transfert d'Énergie par Résonance de type Förster) provoqué par le duplex. L'ajout de la cible libère le brin complémentaire, élimine le FRET et permet le retour d'un fort signal de fluorescence. **(D)** Représentation d'un biocapteur colorimétrique, issue de (Li 2009). Des nanoparticules d'or sont fonctionnalisées avec des aptamères. Après l'ajout de la cible (ici : l'adénosine) les nanoparticules s'agrègent, ce qui provoque un changement de couleur.

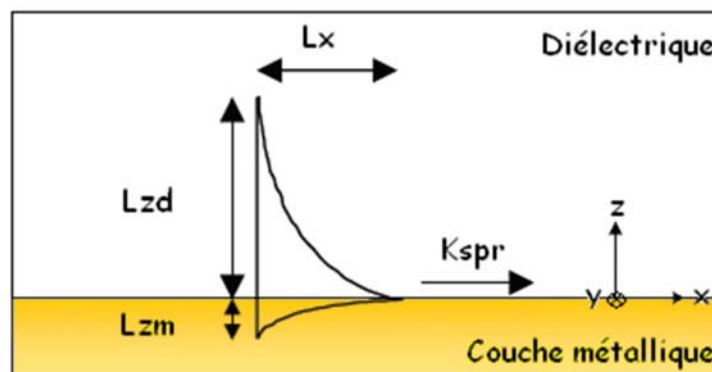
### 1.1.3 Un élément transducteur intéressant : la SPRi

Alors que les aptamères correspondent à un élément de reconnaissance (sonde) pouvant être utilisé dans un biocapteur, un film d'or au sein duquel se propage une onde évanescente produite par résonance plasmonique de surface est au contraire un élément de transduction optique possible qui permet de transformer l'évènement de reconnaissance entre la cible et la sonde en un signal mesurable : c'est le principe de la détection par imagerie de résonance plasmonique de surface (SPRi – *Surface Plasmon Resonance imaging*).

## Le phénomène de plasmon de surface

La résonance des plasmons de surface (SPR) est un phénomène optique découvert en 1902 par R. Wood mais qui ne fut interprété théoriquement qu'en 1941 par U. Fano et réellement étudié qu'à partir de 1968 avec la mise au point des configurations expérimentales d'Otto (Otto 1968) et de Kretschmann et Reather (Kretschmann 1968). Depuis, il est à l'origine du fonctionnement de certains systèmes particuliers de transducteurs (Homola 2008).

Ce phénomène se produit exclusivement à l'interface entre un métal et un diélectrique. Dans certaines conditions, une onde incidente arrivant sur cette interface peut transmettre une partie de son énergie à une onde évanescence, dite onde plasmonique de surface, prenant naissance à cette interface et se propageant le long de celle-ci (**Figure 1.7**). Cette onde est créée par une oscillation collective des électrons libres de la bande de conduction du métal à l'interface entre celui-ci et un diélectrique.



**Figure 1.7** Représentation de l'onde plasmonique de surface à l'interface entre un métal et un diélectrique, d'après (Maillard 2004). La profondeur de pénétration de l'onde dans les matériaux se fait selon la direction  $z$ , perpendiculaire à l'interface, et est caractérisée par les longueurs de pénétration notées  $L_{zd}$  et  $L_{zm}$ . L'onde se propage dans la direction  $x$ , le long de l'interface, et  $K_{SPR}$  désigne le vecteur de propagation de l'onde plasmonique de surface.

La résolution des équations de Maxwell à une telle interface nous fournit quelques indications sur le champ électromagnétique local et les conditions de sa formation :

L'intensité du champ magnétique formé atteint son maximum à l'interface métal/diélectrique et diminue exponentiellement en s'éloignant de l'interface dans le métal et dans le diélectrique. La décroissance du champ dans la direction perpendiculaire à l'interface est caractérisée par la longueur de pénétration du champ, *i.e.* la distance où l'amplitude du champ est réduite à  $1/e$  de sa valeur maximale ( $e$  étant la base du logarithme naturel). Sur la **Figure 1.7** ces longueurs sont notées respectivement  $L_{zd}$  et  $L_{zm}$  pour le diélectrique et le métal. Elles dépendent de la longueur d'onde d'excitation et des constantes de permittivité des matériaux impliqués. Dans le cas où le milieu métallique est de l'or ( $n = 0,208 + i 3,3$  à  $\lambda = 660$  nm) et le diélectrique un tampon salin comme le PBS (*Phosphate Buffer Saline*,  $n = 1,334$  à  $\lambda = 660$  nm) les longueurs de pénétration théoriques ont pour valeurs  $L_{zd} = 102$  nm et  $L_{zm} = 13$  nm (Maillard 2004). On voit ainsi que la majeure partie de l'énergie de l'onde plasmonique de surface est répartie dans le diélectrique.

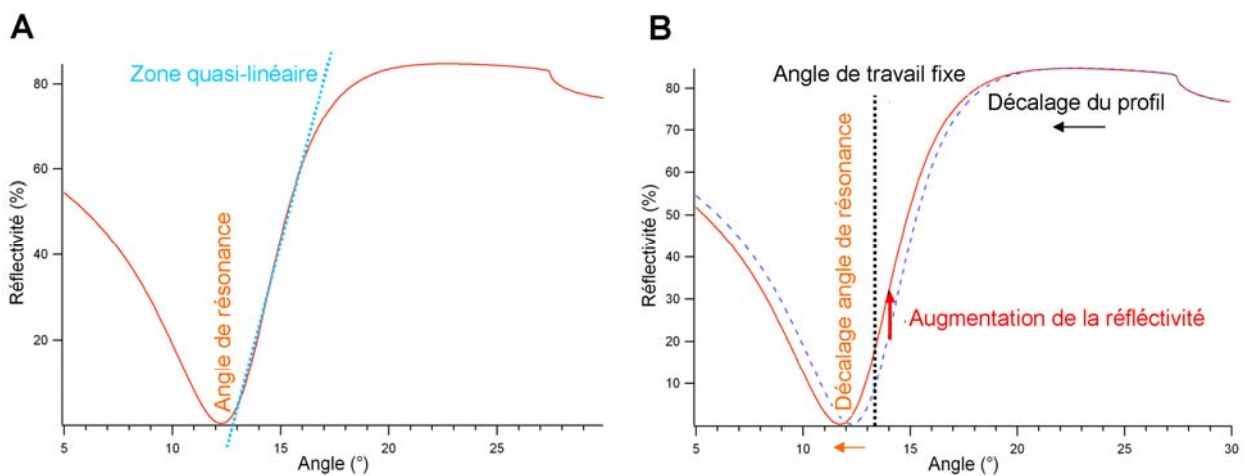
Pour exciter l'onde de surface, la lumière incidente doit nécessairement être polarisée en mode transverse magnétique (TM). De plus, le couplage entre l'onde incidente et l'onde plasmonique ne peut avoir lieu que si la composante du vecteur de propagation de l'onde incidente parallèle à l'interface métal/diélectrique est égale à la constante de propagation de l'onde plasmonique ( $K_{SPR}$ ). La vérification obligatoire de cette égalité montre que pour une interface classique tampon/or, il n'est pas possible d'exciter directement l'onde plasmonique avec un faisceau incident traversant le milieu diélectrique (le tampon), ou simplement l'air, du fait de leur trop faible indice de réfraction : il faut d'abord augmenter le vecteur d'onde de l'onde incidente. Il existe pour cela trois techniques différentes : graver un réseau sur la couche métallique, utiliser un guide d'onde optique, ou placer un prisme haut indice soit sur le diélectrique (configuration de Otto), soit sur le métal (configuration de Kretschmann). C'est cette dernière configuration qui est généralement utilisée pour la biodétection (**Figure 1.9**) puisqu'elle a l'avantage de ne pas perturber le milieu de la réaction biologique (qui constitue le diélectrique de notre système) et qu'elle est relativement simple à mettre en œuvre. Dans ce dernier cas, l'onde incidente traverse le prisme de très haut indice de réfraction avant d'être complètement réfléchi à la base du prisme sur la surface métallique, générant une onde évanescente pénétrant à l'intérieur du fin film métallique. Cette onde évanescente se propage le long de l'interface avec une constante de propagation qui peut être ajustée pour égaler celle de l'onde plasmonique de surface en contrôlant l'angle d'incidence. Lorsque l'angle atteint une valeur particulière, appelée angle de résonance, la condition d'égalité entre les deux vecteurs d'onde est vérifiée et permet à l'onde évanescente de se coupler aux plasmons de surface et de propager l'onde plasmonique de surface, *via* un transfert de l'énergie lumineuse incidente à l'onde plasmonique de surface.

Pour résumer, une onde plasmonique de surface peut être générée à l'interface entre un film métallique et un milieu diélectrique *via* un transfert d'énergie entre une onde lumineuse incidente et le mouvement des électrons en surface du métal. Ce transfert est très sensible à des paramètres tels que : les indices de réfraction des matériaux considérés, la longueur d'onde du faisceau incident et l'angle d'incidence. Pour ce dernier paramètre, on appelle angle de résonance, l'angle auquel le couplage entre l'onde incidente et l'onde plasmonique de surface est parfait, c'est-à-dire l'angle où le phénomène est maximum. Lorsque l'on s'éloigne de cette valeur, le phénomène disparaît très rapidement.

### *Principe et fonctionnement de la détection par SPR*

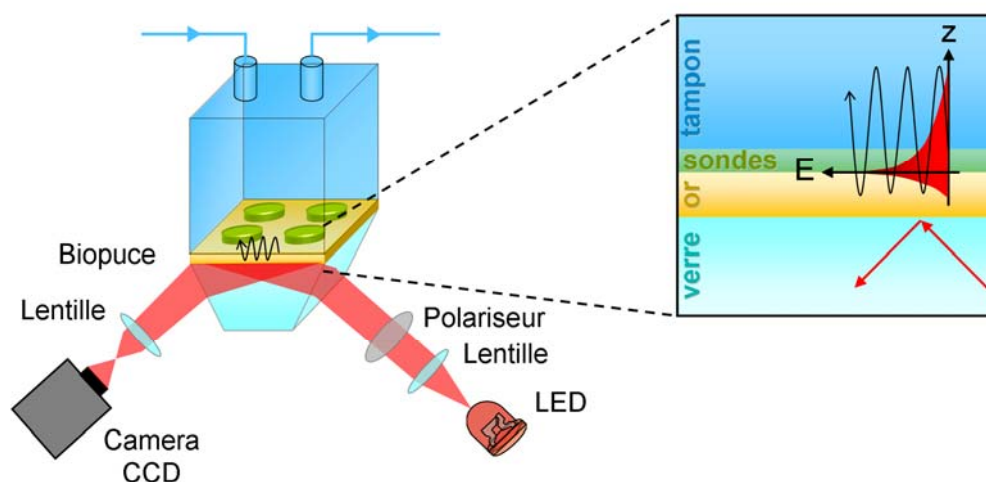
Les systèmes SPR sont utilisés pour suivre en temps réel des interactions se déroulant sur la surface métallique d'une biopuce. En effet, la fixation des molécules cibles sur les sondes de la biopuce modifie très localement l'indice de réfraction du milieu tampon à l'endroit où se déroule l'interaction. Ce changement d'indice de réfraction décale l'angle de résonance du phénomène de plasmon de surface et c'est ce décalage qui est exploité pour générer un signal en temps réel.

Le suivi du décalage de l'angle de résonance peut être effectué de plusieurs manières : par exemple, en suivant effectivement la valeur de l'angle de résonance *via* la variation de l'angle de mesure, ou bien en restant à un angle fixe de mesure constant et en variant la longueur d'onde du faisceau incident. Ces deux modes de suivi (*via* l'angle ou *via* la longueur d'onde) sont traditionnellement désignés sous l'appellation spectroscopie SPR. Un troisième mode de suivi existe, sur lequel se basent les systèmes SPRi : à angle de mesure constant et longueur d'onde constante, une caméra CCD permet d'enregistrer la variation d'intensité du faisceau réfléchi (exprimée en pourcentage de réflectivité, *i.e.* le rapport entre l'intensité du faisceau réfléchi et celle du faisceau incident). En effet le décalage de l'angle de résonance se traduit, à angle de mesure constant et longueur d'onde constante, par une modification de l'intensité du faisceau détecté (**Figure 1.8**).



**Figure 1.8** Profils de couplage théorique (*i.e.* réflectivité vs. angle d'incidence) pour une interface or/tampon PBS, d'après (Maillard 2004). **(A)** Profil avant interaction avec la cible. L'angle de résonance correspond à une chute de la réflectivité due au transfert d'énergie entre le faisceau incident et l'onde plasmonique de surface qui se forme à l'interface : une très grande partie du faisceau n'est donc plus réfléchi. L'angle de résonance dépassé, la réflectivité augmente à nouveau quasi linéairement jusqu'à son niveau maximum. **(B)** Exemple de profil après interaction avec la cible. L'indice de réfraction du milieu a augmenté et provoqué un décalage du profil vers la gauche. Si l'on travaille à un angle de travail fixe situé dans la zone quasi-linéaire, cela se traduit par une augmentation de la réflectivité proportionnelle à l'augmentation de l'indice de réfraction et donc à la masse de cible déposée (dans le cas où l'apport de cible est la seule modification apportée au milieu).

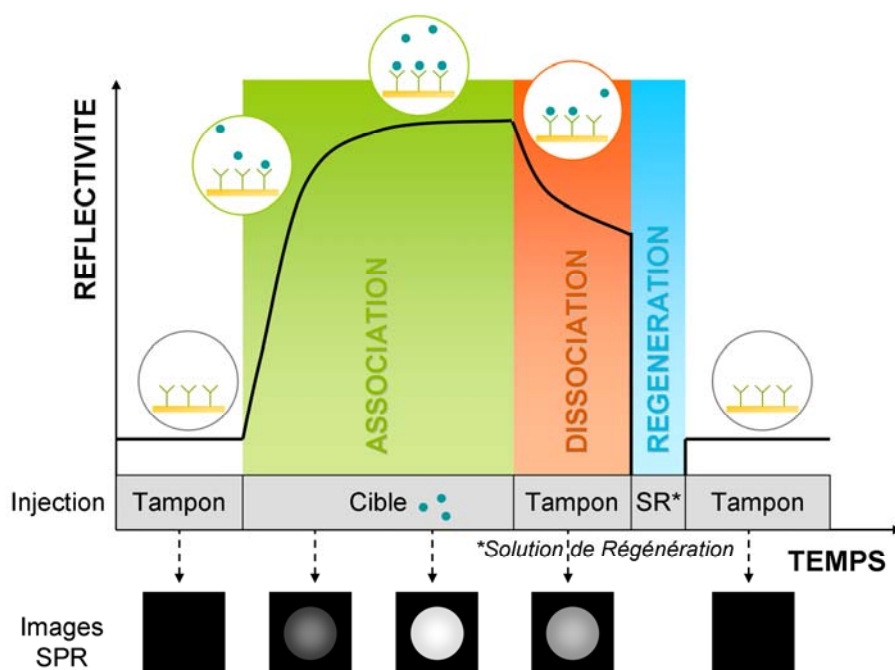
Un système SPRi est donc nécessairement composé d'une source monochromatique générant le faisceau incident éclairant la totalité de la surface de détection, d'une caméra CCD permettant la détection du faisceau réfléchi en temps réel, et d'un polariseur assurant une polarisation possible TM (transverse magnétique) ou TE (transverse électrique) de la lumière incidente. La polarisation TE ne permettant pas l'établissement du phénomène de plasmon de surface, elle est simplement utilisée pour obtenir un signal de référence afin d'améliorer le contraste de l'image. Dans une grande majorité des systèmes SPRi, la configuration de Kretschmann (Kretschmann 1968) est utilisée : la biopuce est alors composée d'une fine couche de métal (le plus souvent de l'argent ou de l'or, d'une épaisseur approximative de 50 nm) déposée sur un prisme de verre haut indice permettant d'ajuster le vecteur d'onde du faisceau lumineux incident, et nécessaire à l'établissement de l'onde évanescente (**Figure 1.9**).



**Figure 1.9** Système SPRi dans la configuration de Kretschmann. Le faisceau lumineux monochromatique généré par une LED se réfléchit sur la surface d'or de la biopuce (épaisseur de 50 nm) après avoir traversé un prisme de verre haut indice. Le faisceau réfléchi est ensuite détecté par une caméra CCD. A l'angle de résonance, une partie de l'énergie du faisceau incident est transmise aux électrons en surface de l'or, qui provoquent l'apparition d'une onde plasmonique de surface évanescence. Celle-ci se propage à l'interface or/tampon en pénétrant dans le milieu liquide sur une profondeur typique de 100 nm. Ses caractéristiques dépendent très sensiblement de la valeur de l'indice local de réfraction du milieu liquide et donc de la présence éventuelle de cibles sur les sondes greffées sur la surface de l'or.

La SPRi permet de cette façon de suivre en temps réel les interactions entre les cibles en solution et les sondes greffées sur la surface d'une biopuce. Via l'utilisation d'une caméra CCD, elle permet d'enregistrer à la fois les signaux sous forme de sensogrammes (*i.e.* mesure de la réflectivité *vs.* temps) et d'images de la puce (**Figure 1.10**). Elle possède de plus l'immense avantage, comparée à d'autres techniques SPR monopoints, d'être une méthode de détection multiplexée, assurant le suivi simultané de plusieurs interactions se déroulant à différents endroits localisés de la surface. En effet si la surface de la puce est divisée en plusieurs zones de reconnaissance (*via* généralement la création manuelle ou automatique de plots de nature différente), cet outil permet le suivi indépendant de chacun de ces plots au cours d'une seule mesure.





**Figure 1.10** Exemple de signal obtenu (à la fois sous forme de sensogramme et sous forme d'images) sur un plot unique lors du suivi par SPR de l'interaction entre une sonde greffée sur un plot et sa cible. L'interaction observée est composée d'une phase d'association lorsque la cible est injectée sur la puce et d'une phase de dissociation lorsque l'injection est terminée. Elle peut être suivie d'une phase de régénération en cas d'injection d'une solution de régénération (typiquement de l'hydroxyde de sodium ou une solution détergente) à la suite de laquelle le signal revient à son niveau de base. La SPRi permet, à travers l'envoi d'un large faisceau lumineux sur toute la surface d'une biopuce et la détection du faisceau réfléchi sur une caméra CCD, d'imager la totalité de la surface et de suivre ainsi plus d'une centaine d'interactions différentes se déroulant sur autant de plots différents, préalablement définis.

### *Avantages et applications de la technique SPRi*

Les principaux avantages de cette technique sont évidents et très attractifs : la SPRi, comme les autres techniques SPR, permet une détection en temps réel des interactions entre les biomolécules ligands et les récepteurs (sondes-cibles), tout en évitant une étape de marquage préalable de la cible qui pourrait perturber cette interaction. La possibilité donnée par le mode imagerie de visualiser la surface entière de la biopuce est particulièrement intéressante : il permet ainsi d'enregistrer jusqu'à plusieurs centaines d'interactions se déroulant simultanément et en continu sur différents plots. L'image délivrée en temps réel par la caméra CCD aide à identifier et réduire les problèmes liés à l'interaction non-spécifique éventuelle entre la puce et la cible (Scarano 2010). De nombreux contrôles négatifs (et positifs lorsque cela est possible) peuvent être mis en place afin d'assurer un signal fiable, nécessaire à la détermination des paramètres cinétiques caractérisant les interactions étudiées.

Cette technique possède néanmoins quelques inconvénients. La méthode étant sensible uniquement à la masse des objets interagissant avec la surface (*via* le changement d'indice de réfraction provoqué par l'absorption de ces derniers) elle est de fait limitée en termes de détection de petites molécules et d'exploration de limite basse de détection (typiquement sub-nanomolaire). Dans ces domaines, la détection de cibles marquées par un élément fluorescent

reste une méthode généralement plus sensible. Cependant, des stratégies d'amplification de signal ont parfois pu être appliquées avec succès. Ces dernières peuvent reposer sur deux concepts différents (Scarano 2010) : structurer la surface de la puce pour augmenter l'intensité du champ évanescent (Mariani 2013) ou augmenter artificiellement la masse du complexe détecté (stratégie employée pour la première fois en 1997 par Jordan *et al.* lorsqu'il exploita la très forte affinité du complexe biotine/streptavidine pour amplifier a posteriori le signal d'hybridation entre un brin d'ADN greffé et un brin d'ADN biotinylé (Jordan 1997). Cette stratégie sera employée et détaillée au chapitre 3 de ce manuscrit).

Une autre limite relative de cette technique est liée au signal non spécifique généré par l'adsorption sur la puce de toute molécule présente dans l'échantillon différente de la cible recherchée. Le signal étant seulement sensible à la masse, il ne permet pas d'identifier la nature des molécules détectées. Un signal faussement positif peut ainsi être généré par l'adsorption de n'importe quelle molécule différente de la cible recherchée. Pour cette raison il est d'autant plus important de disposer de sondes très spécifiques, de contrôles adéquats sur la puce permettant de vérifier la spécificité du signal détecté sur les plots sondes spécifiques, et de limiter par ailleurs au maximum l'adsorption non spécifique grâce, par exemple, à des stratégies de traitement de surface (optimisation de l'étape de greffage des sondes, ajout d'une étape de blocage...).

Malgré ces quelques inconvénients (pour lesquels des solutions peuvent être envisagées), la SPR, et la SPRi en particulier, reste un outil relativement récent (la commercialisation du premier appareil SPR date de 1990) incroyablement versatile et prometteur. Ses avantages de taille (détection en temps réel, sans marquage, et multiplexée dans le cas de la SPRi) expliquent pourquoi la résonance de plasmon de surface s'est imposée en une vingtaine d'année comme une technique de recherche incontournable dans les domaines de la pharmacie, du contrôle de la qualité des aliments, de la surveillance de l'environnement et de l'analyse médicale (Homola 2008). Un nombre important et croissant de revues ont été publiées ces dernières années (Homola 2008; Scarano 2010; Kodoyianni 2011; Spoto 2012) évoquant les avantages, les possibilités et le futur de la SPRi. Les applications sont nombreuses et comprennent notamment l'analyse d'interactions ADN/ADN, ARN/ADN, aptamères/protéines, anticorps/protéines, sucres/protéines, à des concentrations en cible typiquement supérieures ou égales à 1 nM (Seefeld 2011), mais aussi l'étude d'objets biologiques plus massifs tels que des bactéries ou des cellules vivantes (Suraniti 2007). Enfin, la technique elle-même est encore évolutive et certaines innovations (utilisation de nanoparticules pour la LRSP – *Long Range Surface Plasmons*, contribution de la modélisation pour le design de systèmes améliorés...) ont permis et permettront sans doute encore d'améliorer ses performances (Spoto 2012).

## 1.2 Détecter la thrombine

Alors que la partie précédente présentait une brève introduction des biocapteurs et en particulier des aptamères en tant qu'éléments de reconnaissance et de la SPRi comme élément



de transduction, nous allons dans cette partie nous intéresser à la cible que l'on se propose de détecter et d'étudier dans la suite de ce travail de thèse : la thrombine.

### 1.2.1 La coagulation sanguine

Une des plus remarquables propriétés de notre sang est sa capacité à se solidifier ou coaguler. Chez les mammifères, ce processus est initié par la blessure ou destruction des tissus contenant le sang (vaisseaux sanguins) et fait intervenir un nombre important de protéines du plasma<sup>2</sup>, des plaquettes (petits fragments de cellule dépourvus de noyaux qui s'agrègent lors de la coagulation), et certains composants des tissus abîmés mis en contact avec le sang.

Chez les invertébrés, la réaction de coagulation est principalement due à l'agrégation des cellules et leur agglutination. Cependant, chez les organismes vertébrés, les pressions sanguines sont plus importantes et augmentent donc le risque de saignement. Ainsi, les mécanismes pour initier et réguler la coagulation sanguine sont bien plus complexes ! Ils incluent les trois processus généraux suivant : 1) la contraction immédiate des vaisseaux sanguins à l'endroit de la blessure vasculaire (qui permet de ralentir la circulation sanguine), 2) la formation d'un clou plaquettaire de Hayem (formé par l'agrégation des plaquettes), et 3) la formation d'un caillot de fibrine qui stabilise le clou plaquettaire. Ce dernier mécanisme est le résultat d'interactions entre les tissus endommagés et les protéines du plasma, dans une suite de réactions qui se déroulent principalement à la surface des plaquettes activées et d'autres cellules présentant une membrane phospholipidique. L'ensemble de ces réactions est désigné par l'expression : « cascade de la coagulation sanguine » depuis 1964 (Davie 1964), (Macfarlane 1964).

Cette cascade est devenue représentative des phénomènes parfois incroyablement complexes<sup>3</sup> impliqués dans des réactions biologiques critiques. L'arrêt du saignement a été très tôt un enjeu majeur de la médecine : le terme hémostasie vient du grec ancien « heme » signifiant sang et « stasis » signifiant arrêt. Il désigne aujourd'hui à la fois le processus physiologique naturel (constitué des trois phases déjà mentionnées ci-dessus), permettant d'interrompre le saignement pour éviter l'hémorragie, et l'hémostasie médicale *i.e.* tout acte médical consistant à empêcher un saignement lors de l'apparition d'une plaie ou lors d'une intervention chirurgicale. Mais ce n'est qu'au cours du XX<sup>ème</sup> siècle que la compréhension du phénomène naturel s'approfondit peu à peu pour aboutir à la mise en évidence de la cascade de la coagulation telle qu'on la connaît aujourd'hui (**Figure 1.11**). En ouverture d'un numéro du Journal of Biological Chemistry en 2005, le chercheur Earl W. Davie, qui a très fortement

---

<sup>2</sup> Le plasma est le liquide presque incolore qui constitue la composante liquide du sang dans laquelle baignent les éléments figurés, *i.e.* les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes. Il est constitué d'eau, d'ions et de différentes molécules tels que du glucose, des lipides, des hormones et des protéines.

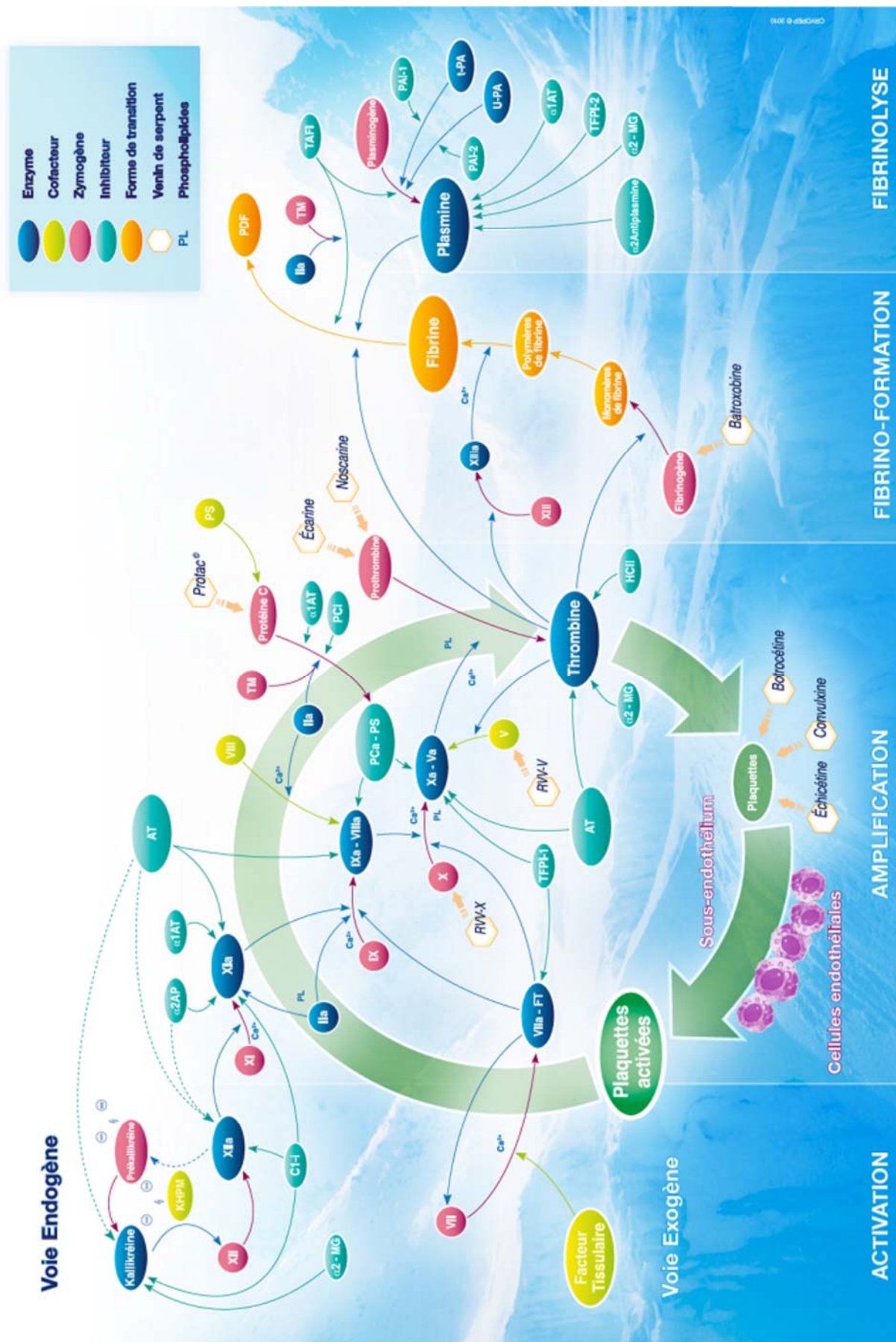
<sup>3</sup> Heureusement, la connaissance du mécanisme complet, décrit sur la Figure 1.11, n'est pas nécessaire pour la compréhension du contenu de ce manuscrit... !

contribué aux recherches menées pendant plus de quarante ans dans ce domaine, a publié l'excellent article intitulé « *A Brief Historical Review of the Waterfall/Cascade of Blood Coagulation* » (Une Brève Revue Historique de la Cascade de la Coagulation Sanguine), sur lequel une grande partie de cette section s'appuie et dont la lecture est fortement recommandée pour tout approfondissement du sujet (Davie 2003).

De façon intéressante, ce sont la découverte et les études croisées d'un grand nombre de cas pathologiques (en particulier les cas d'hémophilie), en parallèle des avancées de la biochimie (technique de purification des protéines, technique de détermination des structures des protéines par rayon X...) qui permirent de passer du modèle très simple et incomplet du début des années 1900 (où seules les dernières étapes avaient été identifiées par Paul Morawitz : la transformation de la protéine prothrombine en thrombine sous l'action coagulante des plaquettes, des tissus endommagés et du calcium ; la thrombine permettant à son tour la transformation de la protéine fibrinogène circulant dans le sang en fibrine insoluble constituant le caillot) à la notion de cascade qui émergea quelques soixante ans plus tard (Davie 1964; Macfarlane 1964). Cette notion repose sur l'important concept qui commença à se développer au début des années 60 : l'idée que les facteurs de la coagulation sont présents dans le sang sous une forme inactive (ou sous forme de « précurseurs ») et sont convertis pas à pas en formes actives *via* des protéolyses partielles (découpage de la protéine en plusieurs morceaux sous l'action d'enzymes de la famille des protéases). Cette idée est aujourd'hui démontrée et est à l'origine de la nomenclature adoptée, par souci de clarté, pour désigner la plupart des facteurs de la coagulation : un numéro en chiffre romain suivi éventuellement d'un « a » pour préciser la forme activée (la prothrombine est ainsi désignée par le numéro II et la thrombine par le numéro IIa).

D'importantes modifications et ajouts furent ensuite régulièrement apportés à ces modèles durant les années qui suivirent, dont l'un des plus importants fut la mise en évidence de deux voies différentes aboutissant à la coagulation, les deux voies se rejoignant au niveau de l'activation du Facteur X (ou Facteur Stuart) (Fujikawa 1974). L'une est plus longue et est appelée voie intrinsèque ou voie endogène. Elle est déclenchée par contact du sang avec la surface du vaisseau sanguin abîmé. La voie extrinsèque, ou voie exogène, est plus courte et commence par la libération de facteurs tissulaires dans le sang : initialement présents dans les tissus entourant le vaisseau, ils passent dans la circulation sanguine suite à la lésion de ces tissus, initiant ainsi la cascade de la coagulation.

Il est généralement admis que c'est la voie exogène qui joue le rôle majeur d'initiateur de la cascade mais que la voie endogène prend rapidement le relais et permet une augmentation rapide du taux de thrombine formée. Dans les deux cas l'aboutissement de la cascade est la transformation du fibrinogène en fibrine sous l'action de la thrombine : la fibrine peut alors polymériser rapidement sous l'action du Facteur XIIIa, et former un caillot insoluble résistant qui vient consolider le clou plaquettaire formé au début du processus d'hémostase, assurant l'arrêt complet du saignement.



**Figure 1.11** Schéma actuel de la coagulation sanguine, issu de (Cryopep 2013)

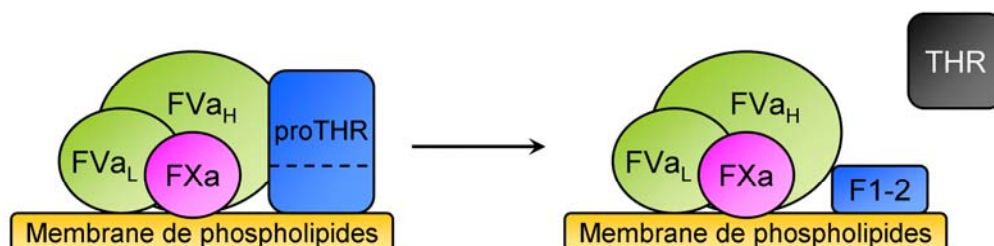
D'importantes avancées ont également eu lieu, en parallèle de l'identification de cette cascade, dans la compréhension de la régulation de cette dernière (en particulier les rôles et mécanismes de certains inhibiteurs présents dans le plasma). Des efforts conséquents furent portés sur la mise en évidence des défaillances pouvant intervenir à chaque étape de la cascade et conduire au développement de maladies vasculaires (les différents cas d'hémophilie déjà évoqués, mais également ceux de thrombose, qui correspondent à la formation anormale de caillot de sang dans un vaisseau pouvant provoquer une embolie), de leurs origines et éventuellement sur la mise au point de leurs remèdes. De nombreux efforts sont encore fournis aujourd'hui dans l'espoir d'améliorer la prise en charge de ces risques et maladies (Povsic 2010; Prandoni 2013; Versteeg 2013).

### 1.2.2 La thrombine : ses rôles et sa structure

Au cours de ce très complexe processus biologique aux multiples boucles de rétroaction, d'activation et d'inhibition, la thrombine (THR) joue un rôle particulièrement important. Comme nous l'avons vu, elle intervient lors de l'étape finale de la cascade pour transformer le fibrinogène soluble en filaments de fibrine insolubles qui encerclent dans leurs mailles les cellules circulantes et forment le caillot.

Il s'agit d'une protéine multifonctionnelle extracellulaire appartenant à la famille des Sérines-protéases (enzymes qui coupent les liaisons peptidiques des protéines)<sup>4</sup>. Son poids moléculaire est de 36 700 Da, son point isoélectrique (pI) compris entre 7,0 et 7,6 et elle est constituée de deux chaînes de respectivement 6 000 Da (36 acides aminés) et 31 000 Da (258 acides aminés) reliées par un pont disulfure.

La thrombine est également désignée par la dénomination facteur IIa et est issue de son précurseur, la prothrombine (facteur II), suite à une protéolyse partielle contrôlée par le facteur Xa dans le complexe prothrombinase (complexe enzymatique composé du facteur Xa ; d'un cofacteur, le facteur Va ; et de phospholipides) (**Figure 1.12**).

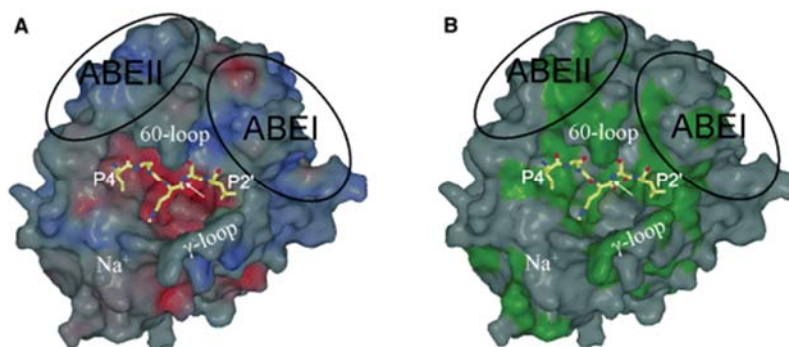


**Figure 1.12** Représentation du clivage de la prothrombine (Facteur II) dans le complexe prothrombinase composé du facteur Xa, du facteur Va (divisé en deux sous unités Va<sub>L</sub> et Va<sub>H</sub>) et de phospholipides aboutissant à la libération de la thrombine (Facteur IIa).

<sup>4</sup> Lien vers la base de données UniProt : <http://www.uniprot.org/uniprot/P00734>

En plus d'être l'unique facteur capable de cliver le fibrinogène pour former le caillot de fibrine, la thrombine est également un régulateur majeur de la cascade de coagulation. Elle agit tantôt dans le sens procoagulant en activant les facteurs V, VIII, XI et XIII ainsi que TAFI (*Thrombin-Activated Fibrinolysis Inhibitor*) qui stabilise le caillot, tantôt dans le sens anticoagulant en activant la protéine C (qui inhibe alors les facteurs Va et VIIIa) (Mann 2003). Certaines de ces activations font également intervenir des cofacteurs. Finalement, deux inhibiteurs naturels sont connus : l'antithrombine III (ATIII) et le cofacteur II de l'héparine (HCII), dont les actions sont grandement renforcées en présence d'héparine.

La multispécificité de la thrombine est due à une structure bien particulière, révélée pour la première fois en 1989, par la méthode de cristallographie aux rayons X (Bode 1989). Elle présente un profond sillon catalytique qui traverse la molécule « d'Ouest en Est », au centre de laquelle se situe le site actif, inhabituellement profond, où a lieu le clivage du fibrinogène. En plus de cette vallée catalytique, la thrombine possède deux domaines remarquables car fortement chargés positivement. Il s'agit de l'exosite de fixation du fibrinogène, appelé ainsi car il est impliqué dans la fixation du fibrinogène sur la thrombine (exosite I), et de l'exosite de fixation de l'héparine (exosite II) (**Figure 1.13**). Il est clair que la thrombine s'appuie sur cette structure unique pour reconnaître ses nombreux substrats. Dans la plupart des cas, au moins l'un des deux exosites est en particulier impliqué dans l'évènement de reconnaissance, soit à travers une interaction directe avec le substrat, soit à travers une interaction indirecte avec un troisième cofacteur (Huntington 2005).



**Figure 1.13** Cartographie de la thrombine (représentée dans l'orientation standard : le site actif en face et le substrat peptidique avançant de la gauche vers la droite dans son orientation N → C-terminal) (Huntington 2005). La surface est colorée d'après le potentiel électrostatique : en rouge pour négatif et bleu pour positif (**A**), ou l'hydrophobicité en vert (**B**). Le site actif est représenté en jaune. Il est inhabituellement profond à cause de la présence des boucles 60- et  $\gamma$ - (*60-loop* et  $\gamma$ -*loop*) au dessus et en dessous du site. Deux exosites ont été identifiés comme critiques pour la reconnaissance des substrats et des cofacteurs de la thrombine : ils sont désignés par les sigles ABEI et ABEII sur la figure pour *Anion-Binding Exosite I* et *II*.

A cause de son rôle déterminant dans l'hémostase, un dérèglement de son activité est souvent impliqué dans les cas d'hémophilie et de thrombose. Pour cette raison la thrombine représente une cible importante pour les traitements anticoagulants et plus généralement le traitement des maladies cardiovasculaires (Lee 2011).



### 1.2.3 Les aptamères anti-thrombine (APT1 et APT2)

La très grande importance physiologique de la thrombine justifia la sélection précoce d'aptamères anti-thrombine en vue d'applications thérapeutiques ou analytique. Elle fut ainsi la première cible protéique choisie pour la sélection d'aptamère ADN en 1992 (Bock LC 1992). A partir d'une banque de candidats oligonucléotides d'une longueur de 60 nucléotides, Bock *et al.* réussirent à isoler une trentaine d'aptamères comportant tous une séquence hautement conservée variant entre 14 et 17 nucléotides. Certains de ces aptamères, en plus de leur affinité pour la thrombine (caractérisée par une constante d'affinité  $K_D^5$  variant entre 25 et 200 nM) présentent des propriétés inhibitrices de la thrombine, réduisant son activité de clivage du fibrinogène. Une séquence minimale et optimale de 15 bases fut finalement retenue :

**APT1 = 5'-GGT-TGG-TGT-GGT-TGG-3'**

A la suite de la sélection de cet aptamère, des études (Macaya 1993; Wang 1993) révélèrent très rapidement la structure de cet aptamère en solution : le repliement de la séquence oligonucléotide forme un quadruplex qui consiste en deux tétrades de G connectées par deux boucles T-T et une boucle T-G-T, visibles sur la **Figure 1.14**.

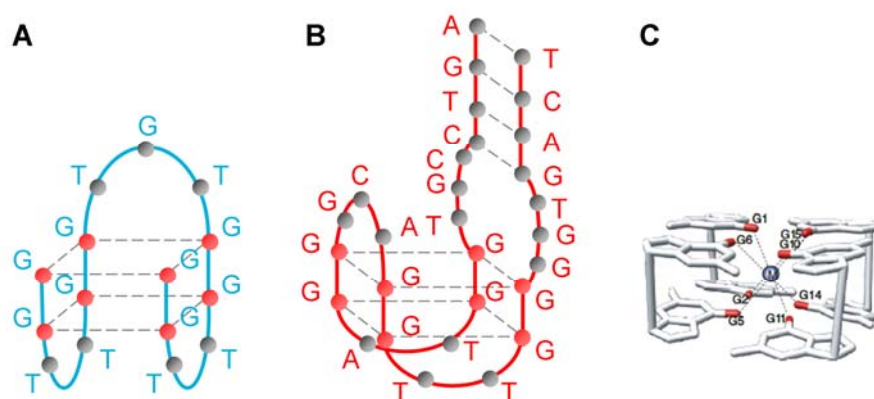
Ces mêmes études établirent que la structure est stabilisée par la présence d'ions  $K^+$ , ce qui fut confirmé par des études ultérieures qui étendirent cette relation à d'autres cations (Kankia 2001), (Shim 2009). Les tétrades de G ont ainsi la propriété de pouvoir s'empiler les unes sur les autres lorsqu'un cation monovalent est localisé entre deux tétrades adjacentes. Le cation permet en effet de stabiliser la structure ainsi formée en coordonnant les groupes carbonyles ( $C=O$ ) des huit résidus Guanine (**Figure 1.14**). Cependant certains cations divalents (comme  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$ ) ne jouent pas le même rôle et peuvent même déstabiliser les quadruplex à forte concentration ( $>10$  mM) lorsque la concentration en ions monovalents est trop faible (Hardin 2000). Ceci montre en particulier l'influence du tampon utilisé lors de la sélection de l'aptamère et, par la suite, de la détection de la thrombine : si le G-quadruplex ne peut pas se former, la reconnaissance ne peut vraisemblablement pas avoir lieu.

Un autre aptamère ADN contre la thrombine fut sélectionné en 1997 (Tasset 1997). Il s'agit cette fois d'une séquence de 29 nucléotides dont un motif de 15 nucléotides est très semblable à APT1 et contient les 8 guanines responsables du repliement en G-quadruplex. Des nucléotides supplémentaires apparaissent de chaque côté de ce motif, dont les quatre dernières bases peuvent s'apparier pour former une structure quadruplex-duplex (**Figure 1.14**). Cette séquence minimale de 29 bases pour une haute affinité (caractérisée par un  $K_D$  en solution annoncé de 0.5 nM) a finalement été retenue après une sélection sur une banque d'oligonucléotides composés d'une région aléatoire de 30 et 60 bases :

**APT2 = 5'-AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT-3'**

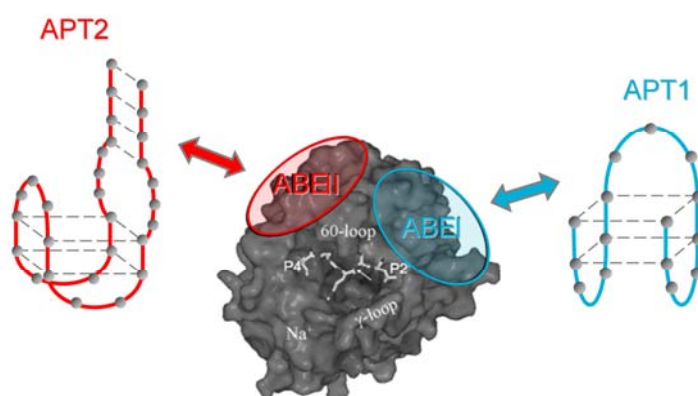
<sup>5</sup> L'association d'un ligand (L) avec un récepteur (R) est caractérisée par la constante d'affinité  $K_D$ , homogène à une concentration (voir partie 2.4.1 Définition et détermination du  $K_D$ , p.66). Plus le  $K_D$  est faible, meilleure est l'affinité entre le ligand et le récepteur.

Les guanines G surlignées en gras correspondent aux nucléotides impliqués dans la formation du quadruplex alors que les nucléotides soulignés en début et fin de séquence correspondent aux nucléotides pouvant s'apparier pour constituer le duplex.



**Figure 1.14** Représentation schématique d'APT1 (A) et APT2 (B). Les tétrades de G sont symbolisées en pointillés, ainsi que le duplex formé par l'appariement des bases complémentaires d'APT2. (C) G-quadruplex (empilement de 2 tétrades de G) stabilisé par un cation (Shim 2009).

Un aspect intéressant de ces deux aptamères réside dans la localisation de leur site d'interaction avec la thrombine contre laquelle ils ont été tous les deux sélectionnés. De premières études ont d'abord montré qu'APT1 se liait avec la thrombine au niveau de l'exosite I (Wu 1992; Paborsky 1993). Cependant, il est à noter qu'au même moment, une étude du complexe de la thrombine avec l'aptamère par cristallographie aux rayons X montrait que dans un cristal, APT1 se trouvait entre deux molécules de thrombine avec lesquelles il interagissait *via* deux sites différents : l'un étant effectivement l'exosite I et l'autre l'exosite II (Padmanabhan 1993). Plus récemment une étude ITC (titration calorimétrique isotherme) déterminait que la stœchiométrie confirmait en solution l'interaction de deux molécules de thrombine avec une seule molécule d'APT1 (Pagano 2008). Concernant APT2, les diverses expériences de compétition menées par l'équipe l'ayant sélectionné ont montré qu'il interagissait clairement avec l'exosite II de la thrombine (Tasset 1997).



**Figure 1.15** Schéma de principe représentant les interactions entre la thrombine et les aptamères APT1 et APT2. Les exosites I et II de la thrombine sont désignés par les sigles ABEI et ABEII, respectivement en bleu et rouge.

Le fait que les deux aptamères puissent interagir avec un domaine différent de la protéine *via* deux sites assez éloignés l'un de l'autre (**Figure 1.15**) permet d'imaginer des systèmes de détection élaborés, basés par exemple sur des structures plus complexes dites « sandwich » (où la protéine interagit avec les deux aptamères à la fois), permettant éventuellement d'améliorer les performances de détection et en particulier la spécificité et la limite de détection. Un nombre croissant d'études depuis la première publication en 2005 (Ikebukuro 2005) ont ainsi déjà exploité cette caractéristique pour élaborer des procédures de détection innovantes variées.

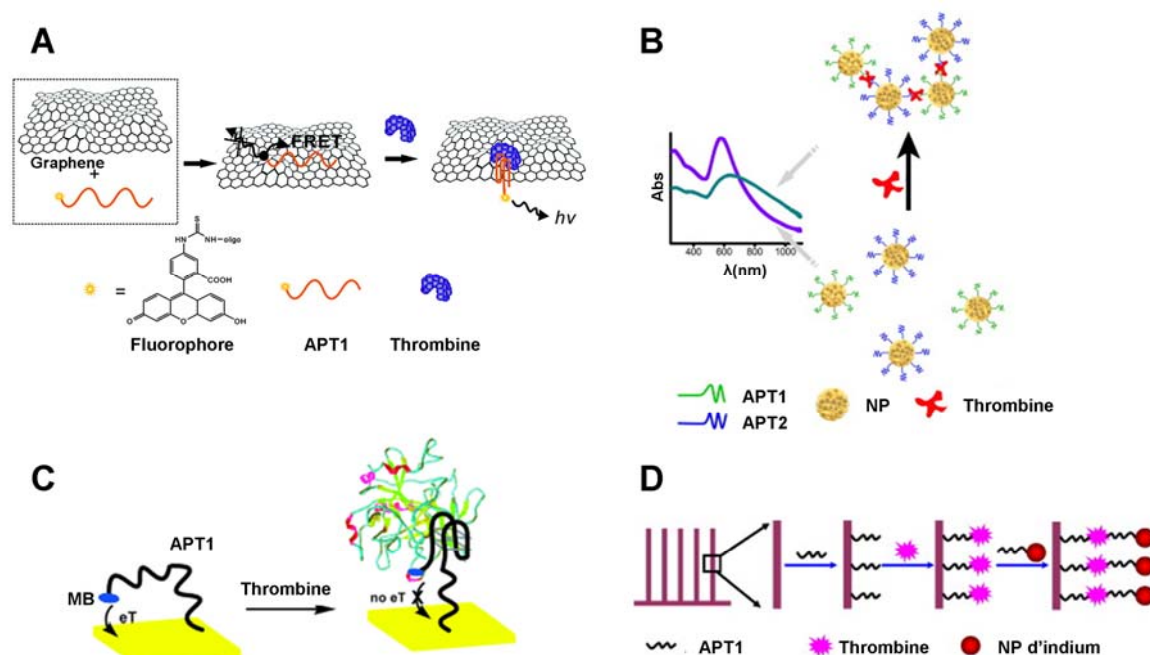
#### 1.2.4 Utilisation des aptamères APT1 et APT2 pour la détection de la thrombine

La majorité des publications parues jusqu'à aujourd'hui décrivant la mise au point d'un biocapteur basé sur l'utilisation d'aptamères (ou *aptasensor*) concerne en réalité l'utilisation de l'aptamère anti-thrombine APT1 (et/ou APT2, dans une moindre mesure) (Tombelli 2007). Ces biocapteurs à thrombine peuvent représenter un réel intérêt de diagnostic : la concentration de thrombine dans le sang varie considérablement et sa quantification peut aider à déceler une anomalie. Totalement absente dans les conditions normales de circulation du sang, sa concentration peut atteindre la gamme micromolaire durant le processus de coagulation et les niveaux plus faibles (de l'ordre du nanomolaire) générés très tôt dans le phénomène d'hémostase sont également importants pour le bon déroulement de l'ensemble du processus (Shuman 1976). En dehors du phénomène d'hémostase, des traces de thrombine circulantes (centaines de picomolaires) ont déjà été détectées chez des patients souffrant de maladies connues pour être associées à des troubles de la coagulation (Bichler 1996). Actuellement, la quantification de la thrombine dans le plasma repose sur des mesures de l'activité de cette dernière en utilisant des substrats chromogènes (Stief 2006). Ces mesures peuvent cependant conduire à des faux positifs, avec des mesures anormalement élevées, dues à la présence dans l'échantillon d'autres protéases que la thrombine hydrolysant le même substrat chromogène (Mani 2011). Un biocapteur mesurant directement la concentration de thrombine pourrait donc être utile au domaine biomédical.

Mais ces aptamères sont aujourd'hui surtout utilisés comme modèles pour démontrer la faisabilité et les performances de nouveaux systèmes de mesure basés sur la technologie aptamère. Ainsi de nombreuses stratégies de détection ont déjà été proposées en laboratoire pour quantifier la présence de la thrombine à l'aide des aptamères APT1 et/ou APT2. On compte parmi elles des techniques de détection par fluorescence (Chang 2010; Wang Y 2011a; Zheng 2012), électrochimie (Xiao 2005; Zheng 2007; Meini 2012; Tang 2012), colorimétrie (Zhang Z 2010; Liang 2011), signaux acoustiques (Jung 2007; Chen 2010), thermiques (Wang 2012) et optiques (Wang 2007; Polonschii 2010; Guo 2011; Shevchenko 2011), pour n'en citer que quelques unes. Une simple recherche bibliographique sur la base de recherche PubMed à partir des trois mots clés *thrombin*, *aptamer* et *biosensor* fournit déjà plus de 200 résultats, dont plus de la moitié furent publiés au cours des trois dernières années : cela suffit à rendre compte de la quantité et



probable diversité des systèmes proposés, ainsi que de l'évolution actuelle très rapide de cet état de l'art (**Figure 1.16**) !



**Figure 1.16** Illustration de différents principes de détection de la thrombine issus de la littérature. **(A)** Détection par fluorescence. Le signal de fluorescence du marqueur fluorophore sur APT1 est éteint lorsque l'aptamère est adsorbé sur la surface de graphène (phénomène FRET). Il est rétabli lorsque la thrombine se lie à l'aptamère, via l'éloignement du fluorophore causé par le repliement de l'aptamère. Issu de (Chang 2010). **(B)** Détection colorimétrique. En présence de thrombine (en haut), les nanoparticules (NP) fonctionnalisées avec les aptamères APT1 et APT2 s'agrègent, modifiant les propriétés optiques de la solution dont l'absorbance est mesurée. Issu de (Liang 2011). **(C)** Détection électrochimique. En présence de thrombine (à droite), le transfert d'électron entre le marqueur redox bleu de méthylène (MB) et l'électrode d'or est inhibé à cause du repliement de l'aptamère. Issu de (Xiao 2005). **(D)** Détection thermique. La thrombine reconnaît les aptamères présents à la fois sur une surface nanostructurée et sur des nanoparticules d'indium (structure « sandwich »). La présence de nanoparticules est alors facilement détectée par calorimétrie différentielle du fait des propriétés thermiques des nanoparticules (enthalpie de fusion basse). Issu de (Wang 2012).

Chacune de ces méthodes possède ses propres avantages et inconvénients, parfois difficiles à évaluer et comparer entre elles, qui joueront un rôle plus ou moins critique selon l'application envisagée du biocapteur. Certains critères de classification sont tout de même assez classiquement utilisés pour organiser et caractériser les différentes méthodes de dosage. Parmi eux on retrouve notamment :

- Le type de dosage effectué. Il peut s'agir d'un dosage en phase homogène où toute la réaction se déroule en phase liquide ; d'un dosage en phase hétérogène où la sonde est greffée sur une surface qui n'est pas en soi un transducteur et qui nécessite une étape de lavage afin de séparer les cibles liées aux sondes des autres espèces présentes en solution ; d'un dosage sur biocapteur au sens restrictif *i.e.* où la sonde est immobilisée directement sur la surface transductrice et où l'étape de lavage n'est par conséquent pas nécessaire ; ou d'un dosage multiplexé sur biopuce où l'analyse de plusieurs cibles en parallèle est possible.

- Le type de marquage utilisé. La méthode de détection peut nécessiter un marquage de la sonde, de la cible, plus rarement des deux, ou d'aucun des éléments impliqués dans la réaction. Le marqueur peut être de différente nature : fluorophore, enzyme, élément redox, radio-isotope ou nanoparticule (NP) par exemple. Ce marqueur, même s'il va bien souvent permettre d'améliorer la sensibilité du dosage, implique un coût supplémentaire correspondant à l'étape de marquage et ajoute surtout le risque de perturber l'interaction sonde-cible.
- Le caractère temps réel ou point final de la mesure. Celui-ci dépend évidemment énormément du type de dosage effectué (un dosage en phase hétérogène ne permettra qu'une mesure en point final, après l'étape de lavage). Le temps réel est utile pour obtenir des informations cinétiques sur l'interaction se déroulant entre la sonde et la cible.
- Le type de la méthode : directe, « sandwich » ou par compétition. Le type direct permet de détecter directement le complexe formé par la sonde et la cible. Le type « sandwich » nécessite la formation d'un complexe de type sandwich où la cible est détectée lorsqu'elle est complexée avec deux sondes : l'une étant la sonde primaire, immobilisée sur une surface et non marquée, l'autre servant de ligand secondaire, à l'origine du signal de détection mesuré, et donc le plus souvent fonctionnalisée avec un marqueur. Bien que le type « sandwich » nécessite le marquage d'une sonde et soit souvent plus long et plus coûteux il permet en général une plus grande sensibilité et sélectivité. Néanmoins deux sondes, capables de reconnaître deux régions différentes de la cible, sont alors nécessaires. La méthode par compétition résulte de la compétition entre deux ligands pour la même sonde, l'un étant précisément contrôlé (et souvent marqué) lors de l'élaboration du système de dosage, l'autre étant l'élément à doser. Le déplacement du signal observé en présence du deuxième ligand fournit l'information quantitative recherchée.

Ces critères sont évidemment à mettre en regard des performances obtenues (en particulier des limites de détection atteignables) et du coût global d'une mesure.

A titre d'exemples, quelques systèmes sont détaillés dans le **Tableau 1.1** ci-après.

| Référence         | Transduction                                      | Type de dosage   | Marquage   | Temps réel / Point final | Type de méthode | Limite de détection |
|-------------------|---|------------------|--|--------------------------|-----------------|---------------------|
| (Meini 2012)      | Spectroscopie d'impédance électrochimique         | Biocapteur       | Aucun  | Point final              | directe         | 80 pM               |
| (Zheng 2007)      | Voltamétrie impulsionnelle différentielle         | Phase hétérogène | Au NP sur APT2   | Point final              | sandwich        | 7,82 aM             |
| (Centi 2007)      | Voltamétrie impulsionnelle différentielle         | Phase hétérogène | Biotine sur APT2 + phosphatase alcaline sur streptavidine          | Point final              | sandwich        | 450 pM              |
| (Wang 2007)       | Electrochimiluminescence                          | Biocapteur       | NP de silice-Ru(bpy) <sub>3</sub> <sup>2+</sup> sur le compétiteur | Point final              | compétition     | 1 fM                |
| (Liang 2011)      | Colorimétrie                                      | Phase homogène   | Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Au NP sur APT1 et APT2             | Point final              | sandwich        | 100 pM              |
| (Zhang Z 2010)    | Colorimétrie                                      | Phase hétérogène | NP magnétique sur APT2   | Point final              | sandwich        | 1 nM                |
| (Polonschii 2010) | SPR   | Biocapteur       | Aucun  | Temps réel               | directe         | 2,5 nM              |
| (Zheng 2012)      | Fluorescence                                      | Phase homogène   | Aucun  | Point final              | directe         | < 200 nM            |
| (Wang Y 2011a)    | Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes | Phase homogène   | Aucun  | Point final              | compétition     | 180 pM              |
| (Chen 2010)       | Microbalance à quartz                             | Biocapteur       | Au NP sur APT2   | Temps réel               | sandwich        | 100 pM              |
| (Wang 2012)       | Calorimétrie différentielle                       | Phase hétérogène | NP d'indium sur APT1   | Point final              | sandwich        | < 22 nM             |

**Tableau 1.1** Quelques exemples de méthodes de détection de la thrombine basées sur l'utilisation d'aptamères issus de la littérature.

Parmi tous les modes de détection utilisables, les méthodes optiques et électrochimiques rencontrent un vif succès et sont à l'origine d'une littérature assez dense, avec plusieurs revues parues ces dernières années exclusivement consacrées à ces modes de transduction associés aux aptamères pour la détection de biomolécules (Willner 2007; Sassolas 2011; Wang RE 2011; Palchetti 2012). Parmi elles, les stratégies de détection optique basées sur la résonance de plasmon de surface (SPR) ont gagné une attention croissante due à leurs avantages de fonctionnement en temps réel, absence de marquage, bonne sensibilité, mode d'opération non destructif (donc réutilisable) et possibilité de multiplexage avec la SPRi.

### 1.3 Objectifs de la thèse

Dans ce travail de thèse, nous proposons de mettre au point un système de détection basé sur l'élaboration d'une biopuce à aptamères et un mode de transduction SPRi afin de démontrer la pertinence d'un tel outil pour la détection, la quantification, la caractérisation et l'étude d'une cible protéique et de ses ligands. Pour cela nous avons choisi la protéine modèle

thrombine, protéine emblématique de la cascade de la coagulation, pour laquelle un intérêt certain existe dans le domaine biomédical. Il s'agit d'une protéine complexe développant de multiples interactions avec de nombreux substrats et cofacteurs et contre laquelle ont déjà été sélectionnés deux aptamères ADN différents (désignés par les sigles APT1 et APT2 dans le présent manuscrit), par ailleurs déjà maintes fois éprouvés pour la mise au point de biocapteurs variés et performants.

En utilisant les deux aptamères simultanément sur une même biopuce, et en enregistrant les interactions générées avec la thrombine à la surface de celle-ci, en temps réel et sans marquage grâce à un appareil SPRi, le but est, dans un premier temps, d'établir un protocole de détection performant capable de rivaliser (en termes de sensibilité, limite de détection...) avec les biocapteurs présents dans la littérature.

Une fois les interactions entre la thrombine et les aptamères caractérisées indépendamment, la biopuce pourra alors être utilisée comme plateforme d'étude d'assemblages plus complexes, à commencer par celui de la formation du complexe « sandwich » de la thrombine entre les deux aptamères. Bien que cette structure ait déjà été décrite à de nombreuses reprises pour le fonctionnement de divers capteurs, les modes de détection employés n'ont permis bien souvent qu'une mesure en point final et nous ont laissé aveugle face à tous les phénomènes dynamiques se déroulant avant d'atteindre l'équilibre du système. Même les rares études en temps réel déjà réalisées en SPR n'ont ni détaillé ni analysé le comportement de cette structure, qui n'est d'ailleurs visualisée qu'en présence d'un facteur amplificateur (nanoparticule ou streptavidine). L'étude dynamique du sandwich *via* SPRi devrait permettre de mieux comprendre le fonctionnement de la thrombine et en particulier de ses deux exosites I et II, mais également d'établir un protocole optimisé d'amplification du signal de détection de la thrombine.

Enfin la biopuce pourra servir de plateforme d'étude de la thrombine en présence de certains de ses partenaires privilégiés tels que les inhibiteurs antithrombine III et cofacteur II de l'héparine. Elle servira également de plateforme d'observation de la transformation *in situ* de son précurseur, la prothrombine, en thrombine.

Ces différents aspects de l'étude de la protéine modèle thrombine permettront de mettre en évidence l'efficacité d'une plateforme de détection composée d'aptamères couplée à une détection SPRi pour l'exploration multiplexée des interactions protéiques.



# 2

## FABRICATION ET CARACTERISATION DES BIOPUCES

La fin du chapitre précédent s'est attachée à décrire la diversité des techniques employées pour détecter la thrombine avec les sondes aptamères APT1 et/ou APT2. En particulier, du fait des avantages précédemment évoqués des méthodes optiques basées sur l'exploitation du phénomène de plasmons de surface, quelques études de détection de la thrombine par SPR ont déjà été réalisées au cours de ces dix dernières années. La première partie de ce chapitre s'intéressera plus en détails aux performances de détection déjà atteintes lors de ces études. Le premier enjeu logique auquel ce chapitre se proposera ensuite de répondre, sera de montrer comment, et en quoi, les biopuces imaginées et élaborées pendant ce travail de thèse peuvent rivaliser, voire dépasser sur certains aspects, ces précédents systèmes. Pour cela une description de la méthode de fabrication des biopuces et du protocole de détection employé sera d'abord développée. Les résultats obtenus pour la détection de la thrombine seront ensuite révélés et comparés à ces précédentes études.

Un des grands avantages de le SPR, nous l'avons vu, est la mesure en temps réel et le suivi des dynamiques d'interaction rendues accessibles par les courbes sensogrammes recueillies. Très souvent, cette technologie est ainsi utilisée afin de caractériser quantitativement l'interaction entre la sonde et la cible étudiée, à travers notamment le calcul de la constante d'affinité ( $K_D$ ) du couple ligand-récepteur. Ce calcul repose sur l'application d'un modèle d'interaction entre des molécules et une surface, développé par Langmuir, aux données expérimentales recueillies par SPR. Bien que représentant une information importante pour la description de l'interaction étudiée et l'analyse de l'éventail des applications envisageables pour le couple de molécules considéré (éventuelles applications

thérapeutiques ultérieures, etc.), cette donnée dépend de nombreux paramètres propres à l'expérience au cours de laquelle elle est déterminée (température, milieu d'analyse, présence de compétiteurs...). En particulier avec la SPR, le  $K_D$ , déterminé à partir des courbes d'association et dissociation de la cible, est le reflet d'une interaction se déroulant à la surface du biocapteur, avec un ligand immobilisé ayant perdu une part de sa mobilité et une influence de la surface elle-même (diffusion, nature de la surface) parfois non négligeable. On comprend donc que la valeur déterminée ainsi, même si elle peut également être pertinente, a de grandes chances de différer sensiblement de la valeur déterminée en solution. Or la valeur en solution peut être plus intéressante pour certaines applications, et notamment une éventuelle utilisation de l'aptamère *in vivo* (par exemple lorsque des applications thérapeutiques sont envisagées). L'écart et le lien existant entre la valeur du  $K_D$  déterminée à la surface et en solution reste encore largement méconnu et variable d'un couple étudié à l'autre. Sous cet angle, la dernière partie de ce chapitre s'attachera à étudier et déterminer cette constante dans le cas du couple thrombine-APT2 en utilisant la biopuce décrite précédemment. Nous détaillerons en particulier la méthode mise au point pour estimer la valeur de cette constante par SPRi en solution, indépendamment des valeurs de surface, et le lien existant entre ces différentes valeurs.

## **2.1 Etat de l'art de la détection de la thrombine par SPR**

Dans la littérature, on dénombre à ce jour un peu moins de vingt études combinant l'utilisation des aptamères APT1 ou APT2 et les avantages d'une technique de détection SPR pour l'étude ou la quantification de la thrombine.

Parmi elles, certaines se sont attachées à mieux décrire et caractériser l'interaction entre la thrombine et le/les aptamère(s), notamment en observant l'influence de certains paramètres sur la reconnaissance (amplitude du signal, cinétique d'interaction,  $K_D$  calculé...) en utilisant une instrumentation SPR, seule (Tang 2007; Ostatna 2008) ou conjointement à d'autres techniques (électrophorèse, résonance magnétique nucléaire NMR, ellipsométrie, dichroïsme circulaire CD, titration calorimétrique isotherme ITC...) (Baldrich 2004; Balamurugan 2006; Centi 2007; Tang 2007).

Parmi les paramètres étudiés on retrouve ainsi : l'influence d'un espaceur entre la séquence aptamère et la surface sur laquelle il est greffé (Baldrich 2004; Balamurugan 2006; Centi 2007; Tang 2007), la méthode chimique d'immobilisation sur l'or (Centi 2007; Ostatna 2008) ou encore la composition du tampon dans lequel se déroule l'interaction (et plus particulièrement la force ionique et le pH) (Centi 2007; Tang 2007; Ostatna 2008; Lin 2011). Sur ce dernier point la présence de KCl semble favoriser l'interaction, ce qui n'est pas surprenant vu que l'ion potassium stabilise le G-quadruplex formé par l'aptamère. Cependant, à forte concentration, l'effet peut s'inverser et perturber la reconnaissance (Tang 2007). De plus un pH relativement neutre est préférable : en dessous de 7,5, la vitesse de dissociation du complexe thrombine-aptamère augmente ce qui montre que le complexe est moins stable (Ostatna 2008). Encore une fois cela est peu surprenant vu que les deux aptamères ont été sélectionnés dans des tampons de

sélection de pH respectifs 7,4 et 7,5 (Bock LC 1992; Tasset 1997). L'influence de la concentration en chlorure de sodium NaCl est différente selon l'aptamère que l'on considère : l'augmentation de sa concentration semble défavoriser l'interaction de la thrombine avec APT1 mais abaisser le  $K_D$  de l'interaction avec APT2 (Lin 2011). L'interprétation qui en est donnée est la suivante : APT1 se lierait à la thrombine *via* une attraction électrostatique et son repliement en G-quadruplex alors qu'APT2 impliquerait une interaction plus hydrophobe et l'appariement du duplex surmontant le G-quadruplex (Lin 2011).

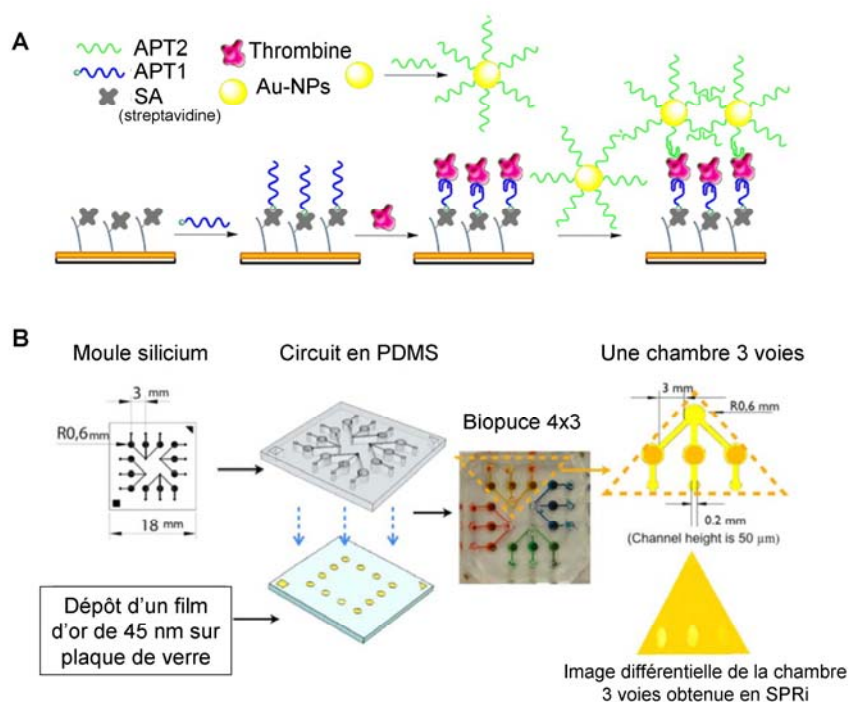
Enfin il est à noter que malgré un  $K_D$  annoncé meilleur pour l'interaction thrombine/APT2, la plupart des études reposent sur l'utilisation d'APT1 (indifféremment des techniques de détection utilisées). Certaines études SPR qui se sont intéressées à la caractérisation des deux interactions (Centi 2007; Tang 2007; Lin 2011; Zheng 2011) permettent d'expliquer ce choix : le signal est systématiquement plus élevé avec APT1. La cause n'est pas très claire mais il est supposé que la structure secondaire d'APT2 étant plus complexe que celle d'APT1, son repliement est plus difficile à contrôler, d'autant plus lorsque la flexibilité est réduite du fait de son immobilisation sur une surface. De plus, APT1 étant plus petit, il aurait peut-être une plus grande chance d'accéder à son site de fixation et la thrombine fixée serait alors plus proche de la surface, augmentant d'autant le signal SPR sensible à la proximité de la cible.

D'autres études SPR se sont intéressées à la thrombine et ses aptamères en tant que modèles pour démontrer l'intérêt et les performances de nouvelles techniques de détection (nouveaux instruments SPR : LSPR (Kim 2008; Guo 2011), Bi-cell SPR (Mani 2011), SPR-Phase Imaging (Zhou 2011) ou Fibre optique SPR (Shevchenko 2011) ; nouvelle plateforme de greffage (Polonschii 2010; Seefeld 2011; Zheng 2011; Jalit 2013) ; nouvelle technique d'amplification (Wang J 2011; Kwon 2012; Bai 2013)).

Ces innovations peuvent permettre d'améliorer les performances de détection. L'amplification du signal par un aptamère secondaire greffé sur une nanobille d'or (**Figure 2.1**) a par exemple permis d'abaisser la limite de détection d'un facteur 4 à 5 comparé à la détection directe sans amplification (Bai 2013), voire d'atteindre des limites de détection de l'ordre de l'attomolaire lorsque des nanoparticules étaient fonctionnalisées avec un anticorps anti-thrombine (APT2 servant de sonde primaire) (Kwon 2012) ! Sur un autre aspect, le développement d'une nouvelle micropuce (Seefeld 2011) a permis la détection record par SPRi de 180 nM de thrombine dans un échantillon de 3  $\mu$ L seulement et en moins de 40 secondes (**Figure 2.1**).

D'autres fois, même si l'innovation proposée ne permet pas d'améliorer les performances brutes de détection, elle permet néanmoins de réduire considérablement les coûts, augmentant le rapport performance/coût à ne pas négliger si l'on espère un passage de la recherche à l'industrialisation. C'est ainsi le principal avantage du développement de nouvelles plateformes d'immobilisation fonctionnalisées avec un film réticulé de BSA et d'acides carboxyliques (Polonschii 2010) faciles à mettre en œuvre et peu coûteuses. Elles ont permis d'atteindre une limite de détection de la thrombine de 3 nM par SPR, quasiment équivalente à celle de 2,5 nM atteinte avec une puce dextran commerciale testée lors de la même étude.





**Figure 2.1** Exemples de techniques développées pour améliorer les performances de détection de la thrombine par SPR. **(A)** Amplification avec des nanobilles d'or, issue de (Bai 2013). **(B)** Représentation schématique de biopuces très faible volume, issue de (Seefeld 2011).

Le tableau suivant (**Tableau 2.1**) récapitule les performances obtenues par tous les montages SPR précédemment évoqués pour la détection de la thrombine. Attention, certaines des références ne sont pas centrées sur la technique SPR et l'utilisent simplement en complément d'une autre technique afin de confirmer ou d'optimiser l'interaction. Dans ce cas, certaines performances (limite de détection /  $K_D$ ) ne sont pas recherchées et donc non mentionnées.

| Référence          | APT    | Immo-<br>bilisation | Technique de<br>détection                     | LDD      | Gamme de<br>détection | KD<br>calculé | Temps       | Ampli-<br>fication   | Milieu<br>complexe           |
|--------------------|--------|---------------------|---|----------|-----------------------|---------------|-------------|----------------------|------------------------------|
| (Baldrich 2004)    | 1      | thiol               | SPR Biacore ( $\Delta A$ )                    | < 5 nM   |                       | 6,6 nM        |             | Non                  | x                            |
| (Balamurugan 2006) | 1      | thiol               | SPR Biacore ( $\Delta A$ )                    | 5 nM     | 5 - 1000nM            |               | 5 min       | Non                  | x                            |
| (Tang 2007)        | 1      | Biotine             | SPR AutoLab ESPR ( $\Delta A$ )               | < 5 nM   | 5 – 250 nM            |               | 20 min      | Non                  | x                            |
| (Ostatna 2008)     | 1      | Biotine             | SPR Modulation spectrale ( $\Delta \lambda$ ) | 5 nM     | 5 – 70 nM             | 40 nM         | 30 min      | Non                  | x                            |
| (Kim 2008)         | 1      | thiol               | LSPR + interférométrie                        | 1 nM     | 1 nM – 100 $\mu$ M    | 45 nM         | 1 h         | Non                  | x                            |
| (Polonschii 2010)  | 1      | Biotine             | SPR Biacore ( $\Delta A$ )                    | 2,5 nM   |                       |               | 20 min      | Non                  | Plasma humain dilué 400 fois |
| (Lin 2011)         | 1      |                     | SPR maison ( $\Delta \lambda$ )               |          |                       | 55 - 488 nM   | 150 s       | Non                  | x                            |
| (Shevchenko 2011)  | 1      | thiol               | SPR Fibre optique                             | 22,6 nM  |                       | 40 nM         | 100 min     | Non                  | Sérum bovin dilué 2 fois     |
| (Guo 2011)         | 1      | thiol               | LSPR  | < 2,7 nM |                       |               | 2 h         | Non                  | x                            |
| (Wang J 2011)      | 1      | thiol               | SPR Autolab Eco Chemie ( $\Delta A$ )         | 17 pM    | 0,27 – 27 nM          |               | 10 + 10 min | APT1 + NP magnétique | x                            |
| (Mani 2011)        | 1      | thiol               | Bi-cell SPR                                   | 25 nM    | 50 – 200 nM           |               | 1 min       | Non                  | Sérum bovin dilué 10 fois    |
| (Zheng 2011)       | 1 et 2 | Amine               | SPR SensiQ Discovery ( $\Delta A$ )           | 5 nM     | 5 – 1000 nM           |               | 5 min       | Non                  | x                            |
| (Seefeld 2011)     | 2      | Amine               | SPRi GWTC Technologies ( $\Delta R$ )         | < 180 nM |                       |               | 40 s        | Non                  | x                            |
| (Zhou 2011)        | 1      | Amine               | SPR-PI  | 100 pM   | 100 pM – 1 nM         | 2,3 nM        | 10 min      | Non                  | x                            |
| (Kwon 2012)        | 2      | Amine               | SPR Biacore ( $\Delta A$ )                    | 1 aM     | 1 aM – 1 fM           |               | > 1h        | Anticorps + Au NPs   | x                            |
| (Jalit 2013)       | 1      | Biotine             | SPR AutoLab ESPR ( $\Delta A$ )               | 12 nM    | 12 – 270 nM           | 43,7 nM       | 30 min      | Non                  | x                            |
| (Bai 2013)         | 1+2    | Biotine             | SPR Biacore ( $\Delta A$ )                    | 100 pM   | 0,1 – 75 nM           |               | 10 + 10 min | APT2 + Au-NPs        | Sérum humain dilué 1000 fois |

**Tableau 2.1** Tableau récapitulatif des performances de détection de la thrombine obtenues par SPR. Lorsque plusieurs performances sont fournies, seule la meilleure est conservée.

## 2.2 Elaboration de la puce et protocole de détection par SPRi

### 2.2.1 Design de la puce

#### *Choix des séquences sondes*

La biopuce est constituée de différents plots organisés sur la surface, correspondant au greffage de différentes sondes. Ces plots permettent l'analyse simultanée par SPRi des interactions entre plusieurs cibles et plusieurs sondes.

Le but étant de détecter la thrombine, les deux séquences aptamères décrites au chapitre précédent APT1 et APT2 sont évidemment utilisées, éventuellement à différentes densités de greffage. En plus de ces séquences, d'autres oligonucléotides servent de contrôle afin de vérifier la spécificité du signal de détection de la thrombine. La séquence de ces contrôles peut varier selon le besoin des expériences réalisées, mais les séquences les plus utilisées en tant que contrôles négatifs sont des séquences facilement disponibles au laboratoire, d'une longueur comparable à celle des aptamères, appelées séquences Zip, n'ayant pas de capacité d'interaction avec des protéines. Elles sont dans la suite désignées par le mot Zip suivi d'un numéro (7 ou 9). Leur séquence ainsi que toutes celles utilisées au cours de ce travail de thèse sont fournies en annexe de ce manuscrit. Les séquences complémentaires des aptamères, notées APT1c et APT2c, peuvent également être utilisées comme contrôle d'hybridation (en particulier au Chapitre 3). Le code couleur employé dans la suite de ce manuscrit pour faciliter la compréhension est le suivant :

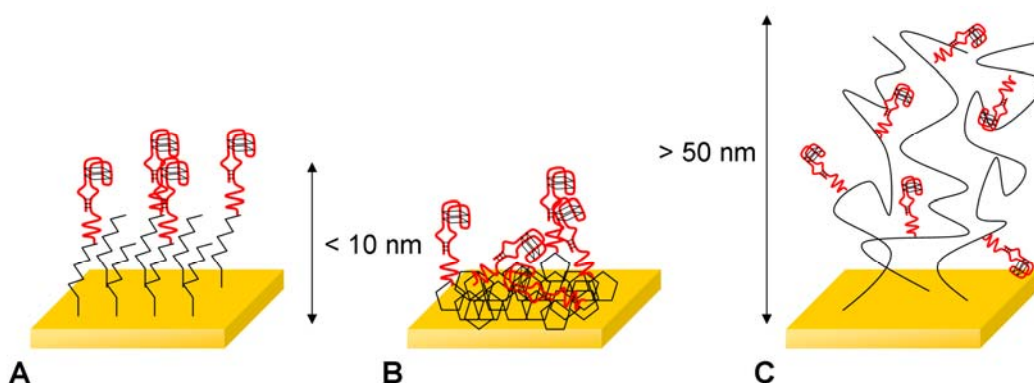
|                         |        |
|-------------------------|--------|
| APT1                    | Bleu   |
| APT2                    | Rouge  |
| Zip                     | Gris   |
| APT1c                   | Vert   |
| APT2c                   | Orange |
| Plot non fonctionnalisé | Noir   |

Chaque sonde est présente sur différents répliquats de plots, généralement au nombre de 3, afin d'éliminer tout risque d'artefact et de contrôler la reproductibilité du signal. Les résultats présentés sur la plupart des figures correspondent à la moyenne des signaux obtenus sur chaque répliquat.

#### *Méthodes d'immobilisation des sondes sur la biopuce*

Du fait du choix de la SPRi comme transducteur, le support physique de la biopuce est imposé par le montage de détection utilisé : il s'agit ici d'un prisme de verre haut indice recouvert d'une nanocouche d'or de 50 nm d'épaisseur (Horiba Scientific-GenOptics, France) sur environ 2 cm<sup>2</sup>.

L'immobilisation d'acides nucléiques (et autres biomolécules) sur une surface d'or est une étape déterminante et relativement bien documentée dans la littérature, avec diverses méthodes de fonctionnalisation possibles : des plus simples, par simple contact en une seule étape (physisorption des biomolécules), aux plus complexes (lithographie et nanobilles en plusieurs étapes (Park 2010)). Du fait de leur aspect pratique et performant, plusieurs techniques sont plus couramment utilisées, en particulier pour une détection SPR : la formation de couches de molécules auto-assemblées (SAMs – Self Assembled Mono- or Multilayers) fonctionnalisées avec les ligands, l'électro-adressage des ligands via une approche d'électropolymérisation (type polypyrrole) ou le piégeage 3D des ligands dans une matrice organique ou polymère (type dextran) (**Figure 2.2**). Certains systèmes commerciaux de détection SPR proposent ainsi la vente de biopuces directement pré-fonctionnalisées et les réactifs/matériels (appareils de dépôt par exemple) nécessaires à l'immobilisation des ligands *via* l'une de ces trois méthodes (Biacore 2013; Horiba-Scientific 2013).



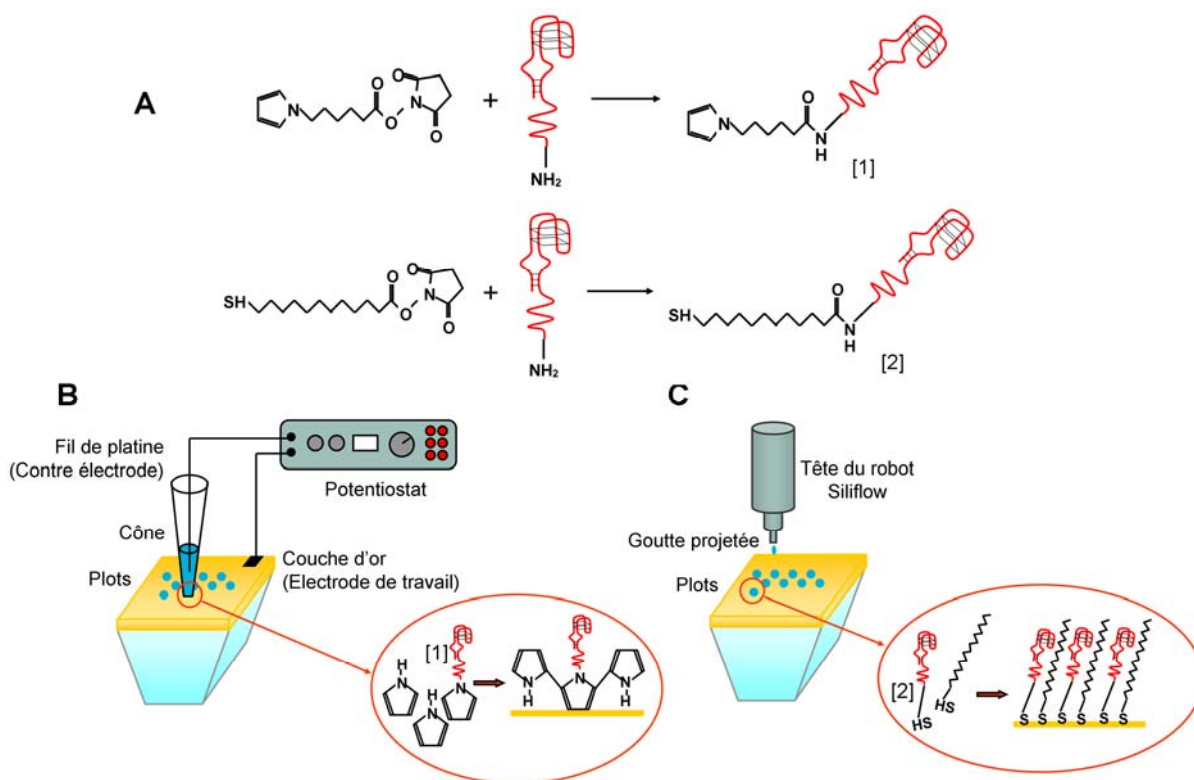
**Figure 2.2** Représentation des différentes chimies de surface utilisables pour l'immobilisation des sondes à la surface. (A) Formation de SAMs. (B) Electropolymérisation (type polypyrrole) (C) Piégeage 3D (type Dextran)

Dans ce travail de thèse, deux de ces techniques ont été utilisées et optimisées en vue d'une détection efficace de la thrombine par les aptamères.

La première est celle de l'électropolymérisation du pyrrole en présence de molécules sondes conjuguées à un monomère de pyrrole. Cette électropolymérisation assure le greffage covalent de la sonde sur la couche de polypyrrole, qui elle-même adhère à la surface d'or de façon très stable (mais non covalente). Le film de quelques nm d'épaisseur ainsi formé est très résistant aux différentes conditions expérimentales. Il est généré par une technique classiquement utilisée et mise au point au laboratoire, basée sur l'utilisation d'un système instrumental maison (Guedon 2000). La surface d'or est micro-organisée sous forme d'une matrice de plots en utilisant une cellule électrochimique mobile (**Figure 2.3B**). Cette cellule est constituée d'un cône de micropipette dans lequel est introduit un fil de platine jouant le rôle de contre électrode. Le cône est chargé avec une solution de dépôt contenant un mélange de monomères libres de pyrrole en large excès et des monomères préalablement conjugués aux sondes oligonucléotidiques, dilués dans un tampon de greffage. Cette conjugaison est réalisée *via* une réaction de couplage entre une molécule de pyrrole activée par un ester N-Hydroxysuccinimide (NHS) et le groupement amine terminal présent à l'extrémité 5' des

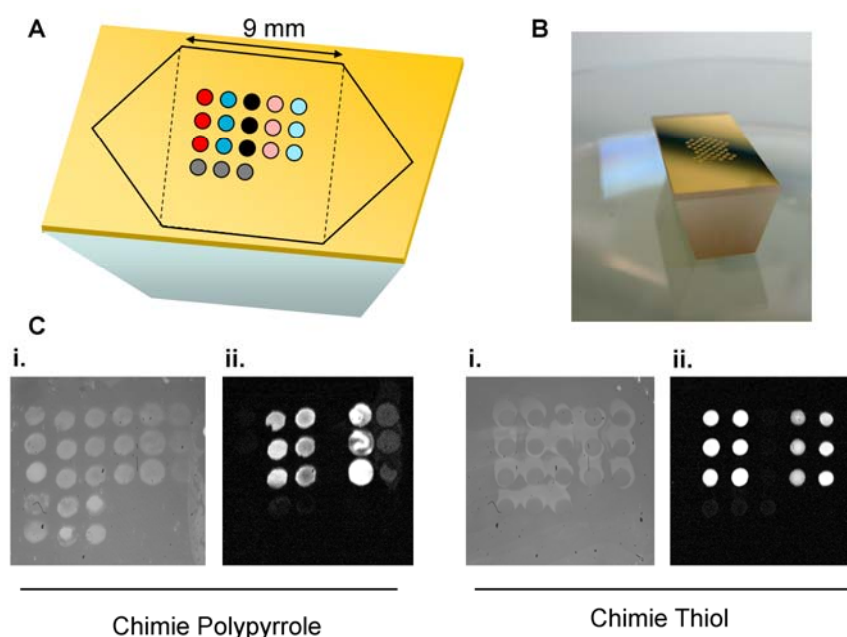
oligonucléotides (**Figure 2.3A**) suivant un protocole inspiré de (Grosjean 2005). Le cône chargé est ensuite déplacé sur la biopuce et mis en contact avec la surface d'or, qui est à la fois le support de la puce et l'électrode de travail. Les molécules de pyrrole, libres et couplées, sont alors co-polymérisées sous l'action d'une impulsion électrique rapide (différence de potentiel appliqué : 2V, durée d'application : 100 ms). Puisque le film de polymère déposé est spatialement délimité par la taille de la cellule électrochimique, la taille des plots ainsi réalisés dépend du diamètre du cône utilisé (entre 500 et 1000  $\mu\text{m}$ ). L'électropolymérisation successive de différentes sondes à différents endroits de la surface permet ainsi l'obtention d'une matrice de plots fonctionnels, caractérisable et utilisable ensuite en SPRi (**Figure 2.4**).

L'autre technique d'immobilisation utilisée a été optimisée pour la détection de la thrombine lors du stage de master 2 de Feriel MELAINE au cours de l'été 2011. Il s'agit cette fois d'utiliser des sondes fonctionnalisées par un groupement thiol, couplées en 5' *via* la terminaison amine à l'aide d'un protocole similaire à celui du couplage avec un monomère de pyrrole (**Figure 2.3A**). Le but est ainsi de former sur la puce des couches de molécules auto-assemblées par simple dépôt sans contact de la solution de dépôt sur la surface d'or. Les plots sont en effet réalisés avec un robot piézoélectrique Siliflow mobile (Siliflow, France) permettant l'éjection de goutte à très faible volume (4 nL) (**Figure 2.3C**). Afin d'assurer la formation correcte de la couche auto-assemblée, les prismes sont nettoyés la veille par un traitement plasma réalisé dans un générateur de plasma Femto (Diener Electronic, Allemagne). Le dépôt des solutions contenant les sondes (en concentrations variables) et éventuellement d'autres molécules co-adsorbantes thiolées (en proportions variables), est réalisé sous atmosphère humide contrôlée (85 % d'humidité) et les puces sont laissées dans cette enceinte humide durant un temps de repos après la fin du dépôt afin de permettre aux molécules thiolées de s'auto-assembler correctement sur la surface. Différents temps de repos ont été observés et 30 min semble être le temps optimal pour assurer une bonne fonctionnalité des plots lors de la détection ultérieure de la thrombine par SPRi. A la suite de ces 30 minutes, le prisme est ensuite laissé à l'air libre sous sorbonne une nuit entière avant d'être rincé à l'eau déionisée et séché sous flux d'argon. Les plots ainsi formés sur la biopuce mesurent approximativement 500  $\mu\text{m}$  de diamètre et sont espacés régulièrement sur la surface tous les 1,25 mm.



**Figure 2.3** Représentation des différentes techniques d'immobilisation testées. (A) Fonctionnalisation des séquences sondes en 5' avec un groupe terminal pyrrole (en haut) ou thiol (en bas). La réaction de couplage s'effectue entre la sonde modifiée par un groupe amine primaire en 5' et une molécule de couplage activée par un ester NHS. (B) Schéma du montage d'électrodéposition du pyrrole se déroulant à la surface. (C) Schéma de la méthode de dépôt sans contact et de l'auto-organisation des molécules thiols (sondes + co-adsorbants) à la surface.

Les biopuces réalisées, que ce soit par chimie polypyrrole ou chimie thiol, ont un aspect similaire à l'œil nu : avant le séchage des gouttes, elles ressemblent au prisme visible sur la **Figure 2.4B**. Les plots sont localisés au centre de la surface d'or, à l'endroit où sera ensuite superposée la chambre de réaction hexagonale utilisée en SPRi, représentée sur le schéma de la **Figure 2.4A**. Les images obtenues ensuite par SPRi diffèrent selon la chimie utilisée (**Figure 2.4C**) : sur les images brutes de gauche, les plots sont plus visibles sur les biopuces réalisées par chimie polypyrrole, du fait de l'indice de réfraction très différent de l'or des films de polypyrrole déposés sur la surface et de l'organisation différente des molécules à la surface (polymère vs monocouche). A la fin d'une injection de thrombine, la soustraction d'une image de référence prise avant le début de l'injection à celle obtenue à la fin (images de droite) permet de mettre en évidence les plots où figurent les sondes aptamères. La thrombine n'étant pas présente sur les plots contrôles, ces derniers n'apparaissent pas (ou très faiblement) sur l'image modifiée, contrairement aux plots aptamères dont le contraste varie plus ou moins intensément en fonction de la quantité de thrombine fixée sur la puce et du traitement d'image réalisé.



**Figure 2.4** Biopuces SPRi fonctionnalisées avec les sondes. (A) Schéma de principe et exemple de plan de dépôt utilisé. Les différentes couleurs correspondent aux différentes sondes déposées sur la biopuce. (B) Photo d'une biopuce après dépôt sans contact. (C) Images des biopuces obtenues par SPRi correspondant aux différentes chimies d'immobilisation utilisées : à gauche la chimie polypyrrole par électropolymérisation, à droite la chimie thiol par dépôt sans contact. Deux images sont fournies : la première correspond à l'image brute de la puce obtenue directement par la caméra CCD (i) ; la deuxième, plus contrastée, correspond à une image différentielle obtenue en soustrayant l'image précédant le début de l'injection de thrombine à celle de fin (ii). Seuls les plots aptamères sont alors visibles, traduisant la présence de thrombine à leur surface.

### Caractérisation des puces

L'un des aspects importants de l'immobilisation de biomolécules sur une surface est la maîtrise de la densité de biomolécules effectivement greffées et celle de biomolécules effectivement accessibles pour la cible (l'écart entre ces deux valeurs pouvant être non négligeable !). Ces densités sont évidemment critiques : trop faibles elles risquent de ne pas être suffisantes pour déclencher un signal de reconnaissance avec la cible observable, trop élevées elles peuvent devenir défavorables à la reconnaissance en provoquant des interactions inter-sondes non désirables ou en limitant l'interaction avec les cibles *via* un encombrement stérique trop important lors de la fixation de ces dernières. L'une des étapes importantes dans l'optimisation d'un biocapteur est donc l'ajustement de la densité de greffage. Pourtant il est assez difficile d'obtenir une quantification exacte de ce chiffre. La méthode la plus précise permettant la détermination du nombre de molécules présentes à la surface (ce qui, à nouveau, ne signifie pas forcément que toutes ces molécules sont aptes à interagir avec la cible : elles peuvent avoir perdues leur activité de reconnaissance, ou bien ne pas être accessibles pour la cible) consiste en un marquage radioactif préalable des sondes et le comptage des radioisotopes après l'immobilisation des sondes *via* la mesure des particules émises lors de la désintégration de ces derniers.

Cette technique a ici été utilisée dans le cas de la chimie thiol grâce à une collaboration avec Didier GASPARUTTO du laboratoire du LAN (Lésion des Acides Nucléiques) du SCIB (Service de Chimie Inorganique et Biologique) au CEA Grenoble.

Pour cela, la séquence APT1, et sa séquence complémentaire APT1c, ont été marquées *via* le remplacement en 5' d'un atome phosphore par un radio-isotope  $^{32}\text{P}$  sur le dernier nucléotide thymine des séquences, sous l'action de l'enzyme polynucléotide kinase T4.

L'immobilisation des sondes fut ensuite réalisée sur des lames d'or  $7 \times 11 \text{ mm}^2$  (3 réplicats pour chaque concentration en sonde testée) entièrement recouvertes de la solution de dépôt (10  $\mu\text{L}$ ) suivant un protocole évidemment différent de celui de l'élaboration des biopuces : le robot Siliflow n'a pu être utilisé afin de ne pas le contaminer (le dépôt s'est donc effectué manuellement avec une pipette) et les surfaces à couvrir étaient beaucoup plus importantes que celles des plots des biopuces afin d'obtenir une quantité suffisante de sondes à détecter. Le temps de repos d'une nuit avant le rinçage et séchage des puces, suivi par la mesure de la radioactivité, fut par contre bien respecté. Les différences de protocole invitent bien sûr à une certaine prudence dans la considération des chiffres obtenus mais permettent néanmoins une certaine estimation de la densité de greffage et surtout de l'évolution de cette dernière en fonction de la concentration en sondes présente dans la solution de dépôt (**Tableau 2.2**). Certaines lames marquées ont ensuite également été utilisées pour un test d'hybridation de la séquence complémentaire (APT1c) consistant au dépôt d'une solution d'hybridation composée de la cible APT1c radio-marquée (2  $\mu\text{M}$ ) diluée dans un tampon d'hybridation pendant 15 min à  $50^\circ\text{C}$ , puis au rinçage des puces et à la comparaison de la mesure de radioactivité avant et après l'hybridation (**Tableau 2.2**).

| Concentration en sondes<br>(en $\mu\text{M}$ ) | Densité de greffage<br>mesurée (en $\text{pmol}/\text{cm}^2$ ) | Taux d'hybridation<br>détecté (en %) |
|--|--|--------------------------------------|
| 0,1  | $1,3 \pm 0,1$  | N/A                                  |
| 1  | $3,2 \pm 0,4$  | N/A                                  |
| 10   | $5,3 \pm 0,7$  | 66                                   |
| 20   | $7,9 \pm 0,7$  | 54                                   |
| 30   | $8,3 \pm 1,6$  | 45                                   |

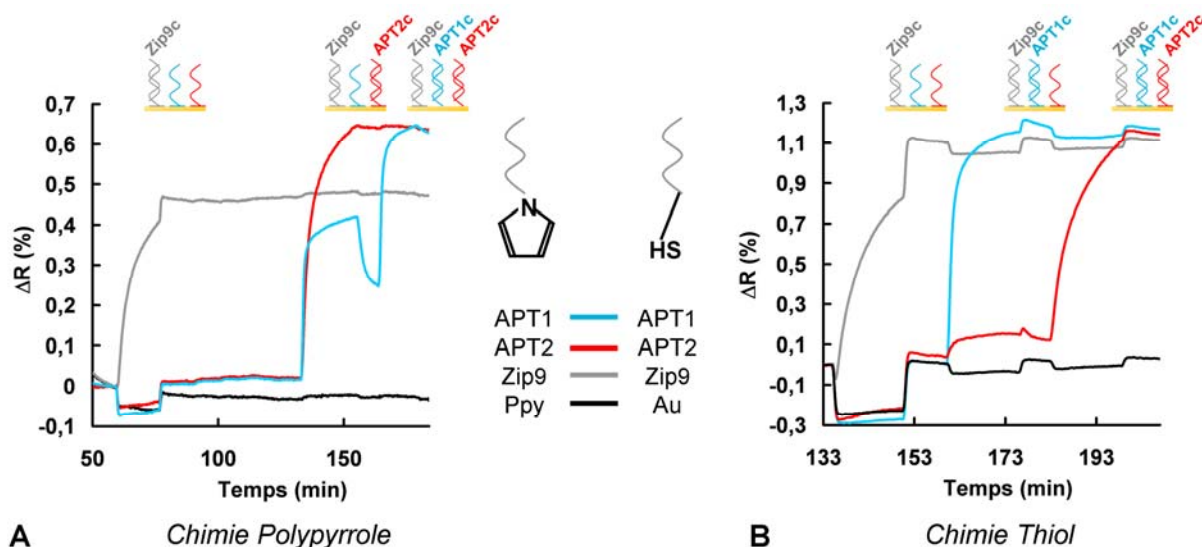
**Tableau 2.2** Mesure de la densité de greffage et du taux d'hybridation par radioactivité. Les sondes marquées sont présentes dans la solution de dépôt en concentration variable (de 0,1 à 30  $\mu\text{M}$ ) et sont co-mélangées avec des PEG thiolés (10  $\mu\text{M}$ ) servant de co-adsorbants. Les valeurs de densité de greffage correspondent aux moyennes de 3 lames  $\pm$  écart type. Les taux d'hybridation sont calculés sur 2 lames seulement.

On remarque tout d'abord que l'évolution de la densité de greffage n'est pas proportionnelle à la concentration en sonde présente dans la solution de dépôt. De plus elle semble saturée à forte concentration : il n'y a plus de grande différence entre les concentrations 20 et 30  $\mu\text{M}$ , pour lesquelles la densité de greffage avoisine les 8  $\text{pmol}/\text{cm}^2$ . Par contre le taux d'hybridation détecté diminue lorsque la concentration en sonde augmente. On peut donc raisonnablement supposer que l'accessibilité des sondes diminue bien avec l'augmentation de la densité de greffage. Il paraît ainsi préférable de se limiter aux concentrations 10 et 20  $\mu\text{M}$ , qui seront celles utilisées tout au long du travail présenté ici.



Cette méthode n'a pas été utilisée pour quantifier la densité de greffage lors de l'immobilisation par électropolymérisation du pyrrole pour plusieurs raisons. D'une part, nous ne disposons pas du matériel approprié pour travailler avec des radio-isotopes (système instrumental d'électrodéposition dédié). D'autre part, il est attendu que l'écart entre la quantité de sondes immobilisées et celle de sondes effectivement accessibles soit encore plus important avec la chimie polypyrrole, comparé au cas de la chimie thiol. En effet le film de polymère déposé à la surface n'est que pseudo-organisé et l'alignement des sondes est donc relativement aléatoire sur la surface, rendant probablement une proportion non négligeable de celles-ci inaptées à reconnaître une cible en solution. La mesure de la quantité de sondes immobilisées est donc largement moins pertinente que pour la chimie thiol. Enfin, la chimie polypyrrole fut finalement abandonnée au profit de la chimie thiol dans la suite des travaux de cette thèse (*cf* section 2.3).

Dans tous les cas, la méthode de quantification des sondes à la surface par marquage radioactif ne constitue, on l'a vu, qu'une mesure approximative du nombre de sondes effectivement capables d'interagir avec un ligand. Afin de mieux apprécier cette capacité des sondes immobilisées, et ce pour chaque biopuce fabriquée, une caractérisation fut réalisée systématiquement par SPRi en début d'expérimentation, avant toute injection de thrombine. Le principe de cette caractérisation repose sur l'analyse du signal d'hybridation obtenu lors de l'injection des séquences complémentaires aux séquences sondes immobilisées sur la biopuce. Même si cette méthode ne permet pas la quantification absolue du nombre de sondes accessibles, elle permet tout de même de comparer entre les plots (et entre les biopuces) la bonne fonctionnalité des plots créés, afin d'éliminer tous ceux ne fournissant pas de signaux satisfaisants lors de cette première étape de caractérisation. De tels signaux sont représentés sur la **Figure 2.5** dans le cas d'une biopuce réalisée par chimie polypyrrole (**Figure 2.5A**) et par chimie thiol (**Figure 2.5B**). Les sauts d'indice, dus au léger changement de composition du tampon lors des injections, sont visibles sur tous les plots, y compris les plots contrôles non fonctionnalisés par des sondes (plots polypyrrole ou or nu). Ces sauts disparaissent à la fin des injections et la différence de signal enregistrée sur certains plots est alors exclusivement due à l'hybridation des séquences injectées.



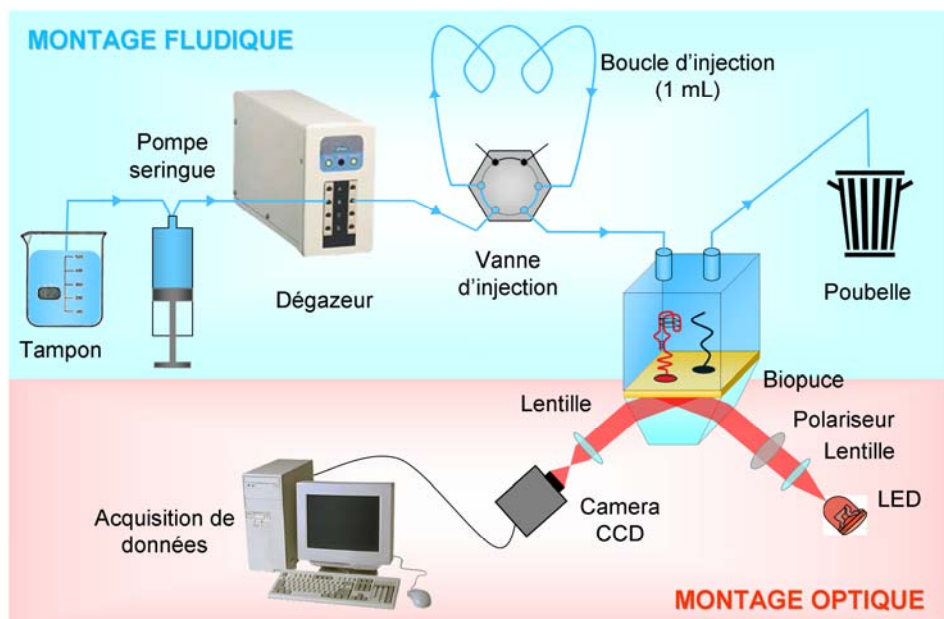
**Figure 2.5** Caractérisation des biopuces en SPRi par l'injection des séquences complémentaires aux oligonucléotides sondes présents sur la puce (Zip7 en gris, APT1 en bleu et APT2 en rouge), dilués dans le tampon de course. Un contrôle négatif sans sonde est également représenté, en noir : polypyrrole (Ppy) ou or nu (Au). Les courbes représentent la moyenne des signaux enregistrés sur trois répliques. **(A)** Biopuce réalisée avec une chimie polypyrrole (concentration des sondes dans la solution de dépôt : 20  $\mu$ M). Les injections, d'une durée de 18 min, sont réalisées dans l'ordre suivant : Zip9c 200 nM – APT2c 500 nM – APT1c 500 nM. **(B)** Biopuce réalisée avec une chimie thiol (concentration des sondes dans la solution de dépôt : 20  $\mu$ M). Les injections, d'une durée de 18 min, sont réalisées dans l'ordre suivant : Zip9c 200 nM – APT1c 200 nM – APT2c 200 nM.

Les signaux d'hybridation obtenus sont reproductibles (sauf en cas de défauts de fabrication). Avec la chimie thiol ils sont toujours compris entre 1 et 1,3 % pour une injection des séquences complémentaires à 200 nM. Pour la chimie polypyrrole, le signal est plus faible ce qui signifie probablement que moins de sondes sont accessibles à la surface. Il est autour de 0,5 % pour l'injection d'une séquence complémentaire à 200 nM (plot Zip9) et entre 0,6 et 0,7 % lorsque la concentration est 500 nM (plots APT1 et APT2). On remarque que lors de l'injection d'APT2c, les plots APT1 génèrent également un signal d'hybridation : cela est dû au fait que les séquences APT1 et APT2 (et donc APT1c et APT2c) sont relativement proches, une partie de la séquence APT2c pouvant s'hybrider partiellement à la séquence APT1. Dans ce cas l'hybridation est tout de même moins stable que lorsque la séquence est parfaitement complémentaire : le signal commence à décroître sur les plots APT1 dès la fin de l'injection d'APT2c et il reste moins important que lors de l'injection d'APT1c. Finalement, les signaux à droite montrent que l'inversion de l'ordre d'injection des séquences (APT1c avant APT2c) permet de limiter le phénomène.

## 2.2.2 Montage SPRi et protocole général de détection

Une fois prêtes à être utilisées, les biopuces sont insérées dans le montage de détection. Celui-ci, visible dans sa globalité sur le schéma de la **Figure 2.6**, est composé de deux parties : un montage microfluidique, permettant d'assurer le transport des différentes solutions jusqu'à la chambre de réaction surplombant la biopuce, et un montage optique SPRi dans la configuration de Kretschmann, permettant la détection des événements de reconnaissance se

déroulant à la surface de la biopuce. Ces deux composantes sont détaillées plus spécifiquement dans cette section.



**Figure 2.6** Montage de détection. Les échantillons sont conduits jusqu'à la biopuce dans la chambre de réaction à travers un circuit microfluidique au moyen d'une pompe et d'une vanne d'injection 6 voies. Le système SPRi de détection est équipé avec une LED ( $\lambda = 635$  nm) et la réflectivité est mesurée par une caméra CCD connectée à un ordinateur sur lequel un logiciel permet d'acquérir les données.

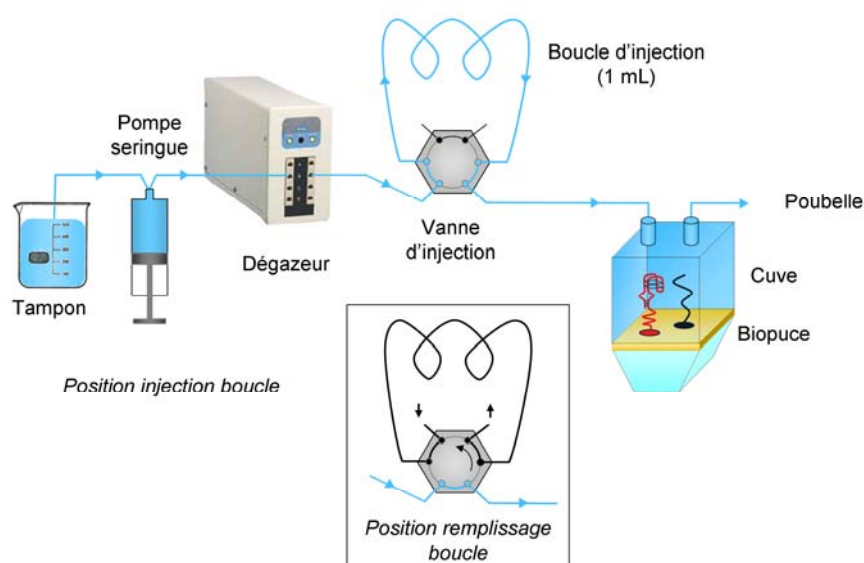
### Montage microfluidique

Le montage microfluidique, détaillé sur la **Figure 2.7**, est composé de plusieurs éléments :

- Une pompe Cavo (Tecan, USA) de type pompe seringue permet d'entraîner en continu le tampon de course utilisé pendant toute la durée des expériences. Ce tampon a été mis au point principalement à partir de la composition des deux tampons utilisés pour la sélection SELEX respective d'APT1 et APT2 (Bock LC 1992; Tasset 1997), afin d'assurer la reconnaissance entre les deux aptamères et la thrombine. Il s'agit d'un tampon Tris-HCl 20 mM,  $MgCl_2$  1mM, NaCl 120 mM et KCl 10 mM, ajusté à pH 7,4, préparé et filtré au laboratoire.

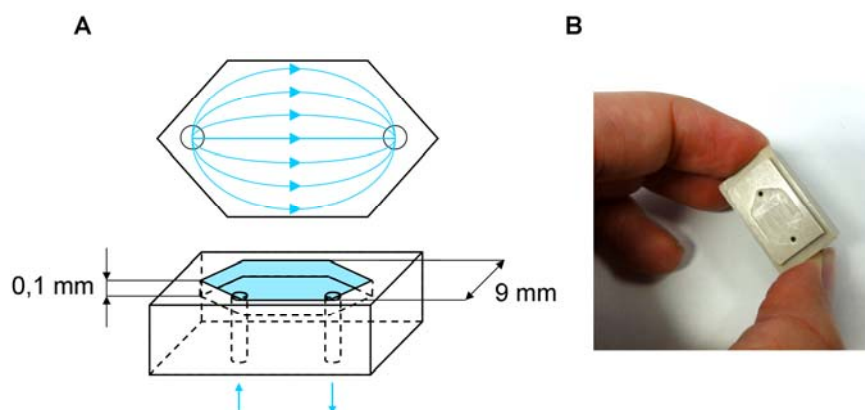
La pompe est contrôlable informatiquement et permet de délivrer le tampon à des débits compris entre 10  $\mu L/min$  et 250  $\mu L/min$ , en mode « aller simple » (tampon uniquement poussé) ou bien en mode « va et vient », qui permet de pousser et d'aspirer alternativement des quantités choisies de volume. Le débit classique utilisé au cours de toutes les expériences est 50  $\mu L/min$ . Le mode « va et vient » est utilisé (avec les paramètres suivants : débit instantané 50  $\mu L/min$ , volume poussé 10  $\mu L$ , volume aspiré 5  $\mu L$ ) lorsque l'on souhaite réaliser des injections « longues » avec une durée d'injection multipliée par 3 par rapport à une injection « courte » classique.

- Le tampon de course passe ensuite dans un système de dégazage (Alltech, France) qui permet de prévenir toute formation de bulle d'air. Celles-ci seraient catastrophiques si elles arrivaient sur la biopuce. L'indice de réfraction de l'air étant très différent de celui du tampon de course, toute bulle détectée en SPRi générerait un signal très important, masquant tout autre signal de détection spécifique sur la surface.
- Une vanne d'injection 6 voies permet en sortie du dégazeur d'injecter, ou non, le volume de liquide présent dans une boucle d'injection indépendante du circuit principal, pouvant être remplie ou vidée manuellement par l'expérimentateur. La boucle utilisée, constituée en matériau PEEK comme tout le reste du circuit, de façon à limiter l'adsorption des molécules biologiques à leur surface, représente un volume d'1 mL. Elle peut être remplie avec une solution à injecter sur la biopuce lorsque la vanne est en position « remplissage boucle » : le tampon de course est alors directement relié à la biopuce et la boucle d'injection est isolée du circuit. En passant la vanne en position « injection boucle », le volume de la boucle est entraîné jusqu'à la chambre de réaction par le tampon de course (**Figure 2.7**).



**Figure 2.7** Schéma du circuit de microfluidique. Le tampon de course est entraîné en continu par une pompe Cavo et passe dans un dégazeur avant d'être injecté sur la puce. La vanne d'injection permet de choisir la position du circuit : en position « injection boucle » le contenu de la boucle (1 mL) est poussé jusqu'à la puce. En position « remplissage boucle » la boucle est soustraite du circuit de microfluidique et peut être vidée et re-remplie manuellement.

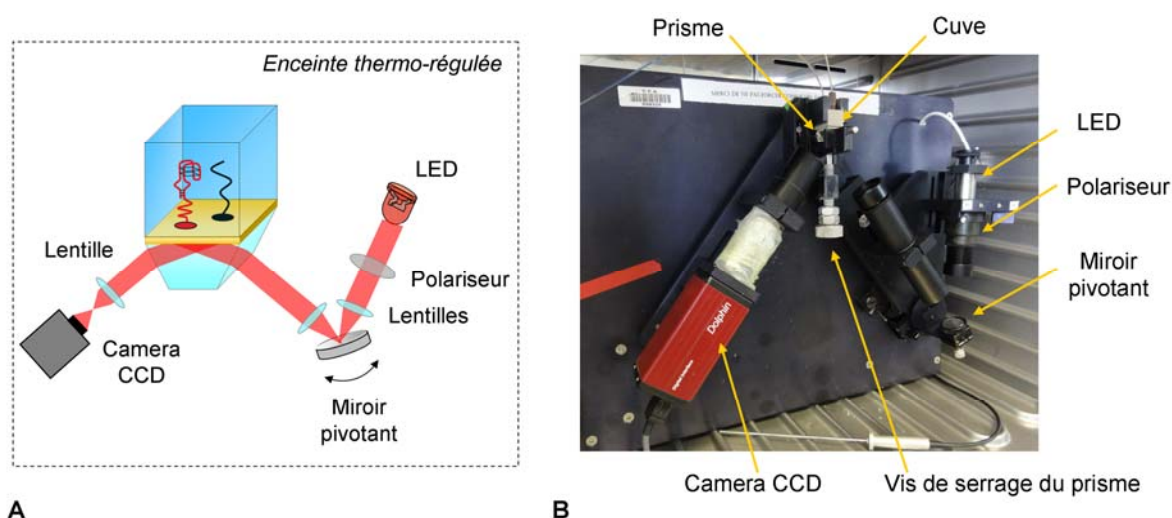
- Enfin, le circuit arrive jusqu'à la chambre de réaction (ou cuve) surplombant la biopuce. C'est à cet endroit que le tampon (ou la solution injectée) arrive sur les plots sondes à la surface de la biopuce avant d'être éjecté vers la sortie. La chambre de réaction utilisée est une cuve hexagonale visible sur la **Figure 2.8**. Elle représente un volume total de 15  $\mu\text{L}$ . Le volume de liquide contenu dans la chambre de réaction est donc entièrement renouvelé en moins de 20 secondes pour un débit de 50  $\mu\text{L}/\text{min}$ .



**Figure 2.8** Schéma (A) et photo (B) de la cuve hexagonale utilisée. Le sens du flux est représenté par des flèches bleues sur le schéma de gauche.

### Montage optique de SPRi

La détection optique est réalisée par un appareil SPRi (Horiba Scientific-GenOptics, France) composé principalement d'une source de lumière monochromatique de type LED ( $\lambda = 635$  nm), d'un polariseur (utilisable en position TM ou TE), d'un miroir pivotant permettant de varier l'angle d'incidence et d'une caméra CCD (16-bit) collectant la lumière réfléchie sur toute la surface de la biopuce (**Figure 2.9**). L'ensemble du montage optique ainsi que la biopuce et la chambre de réaction sont placés dans une enceinte thermo-régulée à 25°C afin d'éliminer toute influence de variation de température sur le phénomène de plasmon de surface. Les données sont ensuite enregistrées grâce à un logiciel fourni par Horiba Scientific-GenOptics qui permet d'observer les variations de réflectivité (en %) sur différentes zones sélectionnées de la surface.

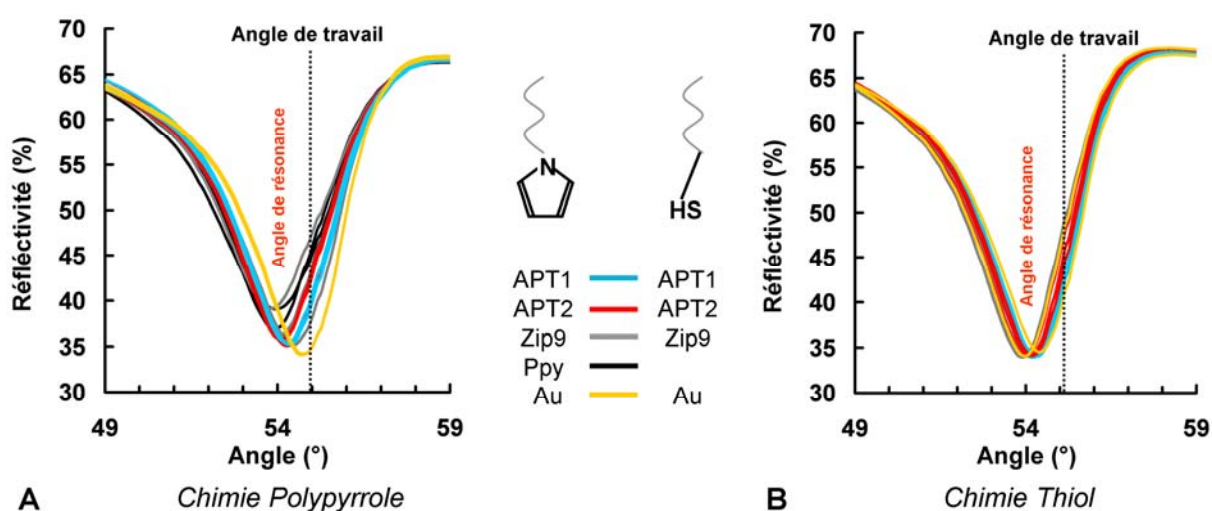


**Figure 2.9** Schéma (A) et photo (B) du montage optique SPRi utilisé.

## Traitement des données

Le logiciel permet d'enregistrer les données sous forme d'images (images brutes délivrées par la caméra CCD ou images différentielles correspondant à la soustraction d'une image de référence définissable à tout moment, typiquement juste avant une injection, à l'image en cours d'acquisition) et de valeurs de réflectivité (en %) détectée sur chaque plot en fonction du temps (38 valeurs et images par minutes) permettant le tracé des courbes cinétiques (variations de réflectivité en fonction du temps).

Le logiciel permet également en début d'expérience de tracer et d'enregistrer les courbes de plasmons (ou profils de couplage : réflectivité vs angle d'incidence du faisceau lumineux) des différents plots préalablement manuellement délimités sur une première image de la surface. Ces profils permettent de sélectionner judicieusement l'angle de travail auquel sera ensuite enregistrée toute l'expérience (**Figure 2.10**).



**Figure 2.10** Courbes de plasmon et choix de l'angle de travail SPRI. (A) Biopuce réalisée avec une chimie polypyrrole (concentration des sondes dans la solution de dépôt : 20  $\mu$ M). (B) Biopuce réalisée avec une chimie thiol (concentration des sondes dans la solution de dépôt : 20  $\mu$ M)

Nous pouvons tout de suite observer la différence de profils obtenus selon la chimie de greffage utilisée pour élaborer la biopuce. Avec le polypyrrole, les courbes correspondant aux différents plots sont plus dispersées alors qu'avec les thiols les courbes sont beaucoup plus superposées et proches du profil étroit de l'or nu. Ceci est dû à l'influence de l'épaisseur du film de polypyrrole polymérisé dont l'indice de réfraction est très différent de celui de l'or, et dont la reproductibilité peut varier d'un plot à l'autre. Les couches auto-organisées de molécules thiols, au contraire, ne provoquent qu'un faible décalage du profil plasmon. D'après ces courbes on peut déjà s'attendre à une meilleure sensibilité des biopuces réalisées par chimie thiol : la pente des courbes de plasmon est bien plus élevée (et plus uniforme) que celles des plots polypyrrole.

Une fois l'angle de travail sélectionné, l'expérience peut commencer à être enregistrée. Les résultats sont observables directement en temps réel sur le logiciel mais les données sont



généralement collectées à la fin de l'expérience afin d'être traitées. Le traitement peut comprendre différentes étapes selon les besoins. Il est pour la plupart réalisé sous le logiciel Excel et automatisé en partie grâce à l'utilisation de macros développées au cours de cette thèse. Les étapes de base possibles sont par exemple : la remise à 0 de tous les signaux avant une injection via la soustraction pour tous les plots de la valeur initiale de réflectivité enregistrée juste avant le début de l'injection (ceci correspond graphiquement à observer les images différentielles plutôt que les images brutes), le calcul de la moyenne des signaux obtenus sur les différents réplicats d'une même espèce sonde, ou encore la correction des signaux par un signal de référence choisi sur un plot contrôle (étape utile lorsque l'on souhaite supprimer les sauts d'indice du milieu injecté ou éliminer la part de signal non spécifique détectée sur tous les plots). Afin de faciliter la compréhension des résultats présentés dans ce manuscrit, certaines de ces étapes peuvent avoir été effectuées sur les données représentées dans ce manuscrit. Dans ce cas, ces traitements seront toujours mentionnés en légende des figures, excepté la remise à 0 avant la première injection d'intérêt présentée sur chaque figure, systématiquement réalisée afin de faciliter la comparaison des signaux obtenus entre les différentes espèces de plots.

### 2.2.3 Optimisation du blocage de la puce

L'un des facteurs limitant les performances des biocapteurs est la présence de signal non spécifique, *i.e.* tout signal observé qui n'est pas produit par la reconnaissance spécifique entre la sonde et la cible étudiée. En particulier en SPR, toute molécule s'adsorbant à la surface génère un signal si sa masse est suffisamment importante, qu'elle ait été reconnue spécifiquement par la sonde ou non. De ceci découle évidemment l'importance de disposer des sondes bien spécifiques pour la cible désirée (et les aptamères sont des sondes répondant à ce critère de spécificité), mais également de disposer d'une surface-support passive, non susceptible d'adsorber des molécules biologiques du type de celles présentes dans les échantillons à tester. En particulier, dans le cas d'étude de protéines, il est important que la surface utilisée soit inerte vis-à-vis de ces dernières. Or ce n'est pas le cas de l'or nu sur lequel de nombreuses protéines peuvent se déposer.

Des expériences ont été réalisées sur des biopuces n'ayant subi aucune étape de blocage préalable à la détection de thrombine (simple dépôt des sondes sur l'or nu, soit par électropolymérisation du polypyrrole, soit par formation de couches auto-assemblées de sondes thiolées sans co-adsorbants, rinçage à l'eau distillée, séchage et utilisation de la puce pour la détection de la thrombine) et dans ce cas le signal spécifique détecté est effectivement très faible, la thrombine s'adsorbant probablement sur l'intégralité de la surface disponible. Une étape d'optimisation du blocage de la puce a donc été nécessaire lors de la mise au point du protocole de détection de la thrombine.

Une stratégie commune et simple à mettre en place consiste à passiver la surface une fois les sondes déposées, en immergeant la surface dans une solution concentrée en protéines afin de bloquer les sites susceptibles d'interagir de manière non spécifique avant le début de

l'expérience. Cette stratégie fut testée sur les premières puces réalisées à partir de la chimie polypyrrole. L'influence de différentes protéines (BSA, cytochrome c, prothrombine) furent évaluées, ainsi que différents temps d'incubation (blocage sur la nuit, en 1h, durant des injections de quelques minutes...) et la meilleure stratégie s'est révélée être l'incubation de la biopuce pendant 1h30 à température ambiante, juste avant le début d'une expérience, dans une solution de blocage constituée d'un mélange de BSA 500 nM et de cytochrome c 500 nM dilués dans le tampon de course. Ces deux protéines sont très différentes : la BSA est une protéine de masse moléculaire 69,3 kDa avec un point isoélectrique de 4,7, alors que le cytochrome c (cyt c) est une protéine beaucoup plus petite (12,4 kDa) avec un point isoélectrique plus élevé autour de 10. Dans le tampon de course à pH 7,4 les deux protéines n'ont donc pas la même charge nette et il est probable qu'elles ne réagissent pas de la même façon avec la surface, adoptant un comportement complémentaire pour mieux couvrir la surface entre les sondes. Cette procédure a donc été adoptée par la suite systématiquement avant chaque expérience.

Plus spécifique à la chimie thiol, une autre stratégie connue dans ce domaine est la formation d'une couche passive auto-assemblée de molécules thiols sur toute la surface d'or. Cette stratégie a été testée au cours de l'optimisation du protocole de greffage par chimie thiol. Deux composants ont d'abord été testés selon une procédure en deux étapes ayant déjà fait ses preuves (Balamurugan 2006) : le 6-Mercaptohexanol ( $\text{OH}-(\text{CH}_2)_6\text{-SH}$ ) et le 1-Dodécane-thiol ( $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{11}\text{-SH}$ ). Cette procédure consiste dans un premier temps à greffer localement les aptamères par la méthode habituelle déjà développée précédemment (robot Siliflow) puis à bloquer la surface d'or entière avec l'élément co-adsorbant choisi. Enfin, un blocage classique à la BSA + cyt c est également réalisé. Cependant, même si la littérature semble être formelle à propos de l'efficacité de l'utilisation de co-adsorbants pour l'immobilisation d'ADN (Fuchs 2010), et en particulier d'aptamères ADN (Balamurugan 2008; Zhang X 2010), notre protocole a montré une meilleure sensibilité de détection lorsqu'aucun de ces deux co-adsorbants n'étaient ajoutés sur la puce, avec un meilleur ratio signal/bruit du signal détecté lors d'une injection de thrombine 50 nM.

Une autre procédure fut finalement testée, consistant cette fois à former des SAMs *mixtes* sur les plots de détection en ajoutant un co-adsorbant directement lors du dépôt des sondes, en une seule étape. L'idée est d'adsorber sur la surface active à la fois l'aptamère d'intérêt et une autre molécule thiol afin de : 1) réduire le taux d'aptamères adsorbés non spécifiquement sur la surface (les oligonucléotides étant susceptibles d'interagir avec l'or *via* les groupes azote des bases nucléotidiques) et 2) couvrir les sites de l'or inoccupés par les aptamères pour éviter l'interaction ultérieure non spécifique des protéines. Le co-adsorbant choisi fut cette fois un polyéthylène glycol (PEG) thiol ( $\text{CH}_3\text{O-PEG-SH}$  2 kDa), ajouté à une concentration finale de 10  $\mu\text{M}$  dans la solution de dépôt. L'emploi de PEG comme diluants dans les couches auto-assemblées est en effet déjà connu pour éliminer efficacement les interactions non spécifiques et espacer correctement les sondes sur la surface (Love 2005). C'est cette dernière stratégie qui a permis l'amélioration considérable de la sensibilité de détection des biopuces réalisées par



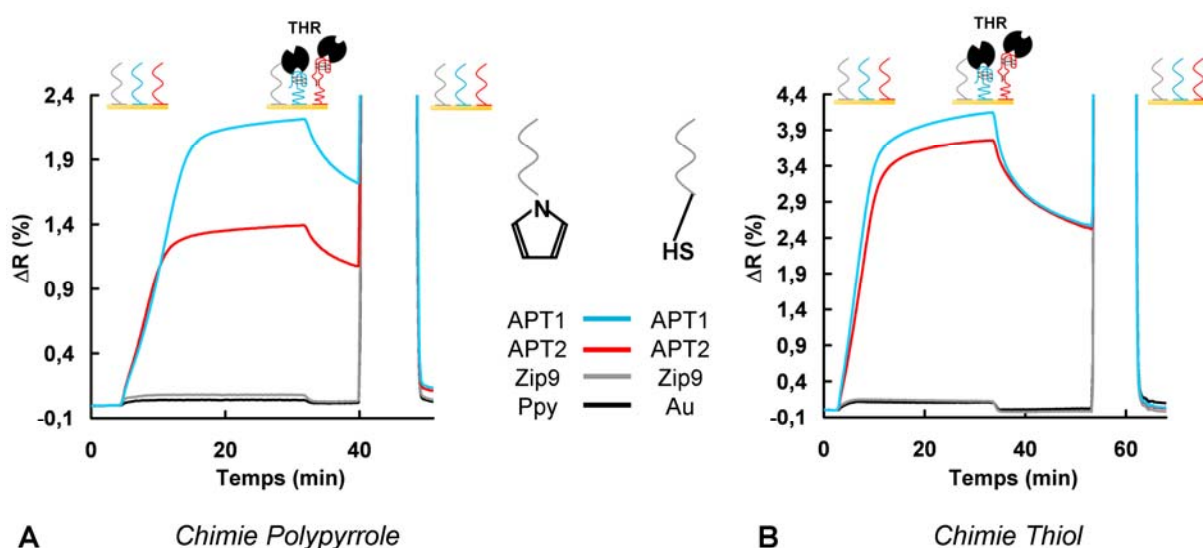
chimie thiol, avec une multiplication par 2 du signal de détection de la thrombine 50 nM et une réduction du signal non spécifique détecté sur les plots contrôles. L'ajout de 10  $\mu\text{M}$  de PEG thiols dans les solutions de dépôt fut donc systématiquement réalisé lors de l'élaboration des biopuces à chimie thiol, dont les performances sont discutées dans la suite de ce manuscrit.

## 2.3 Performances des biopuces

### 2.3.1 Détection classique et gamme de concentration

Nous pouvons dans un premier temps observer les performances de détection de la thrombine en comparant les deux chimies employées pour l'élaboration des biopuces.

La **Figure 2.11** présente ainsi les signaux détectés pour une injection standard longue (mode « va et vient » activé) de thrombine à 50 nM dans le tampon de course, suivie d'une étape de régénération par l'injection courte d'une solution de sel NaCl 1M.

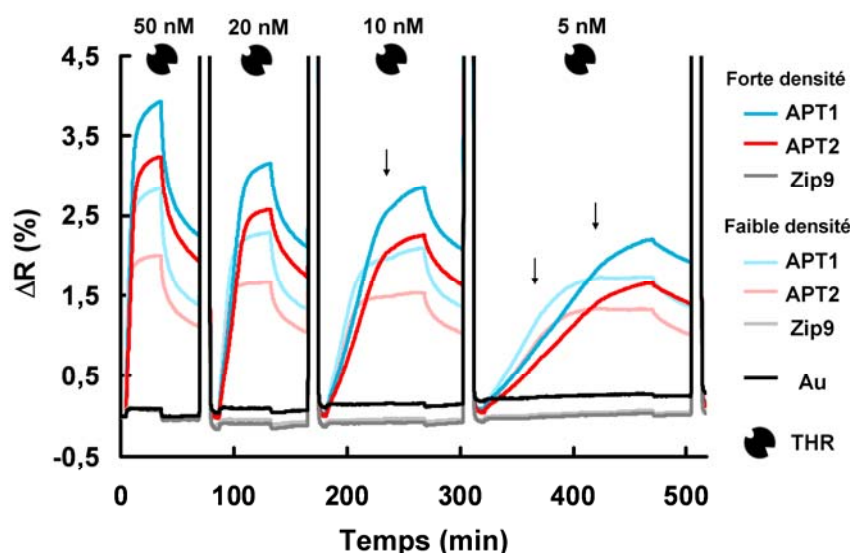


**Figure 2.11** Comparaison des biopuces fabriquées par chimie polypyrrole et par chimie thiol : résultats obtenus lors d'une injection « longue » de thrombine (THR) 50 nM. Chaque courbe correspond à la moyenne des signaux obtenus sur 3 réplicats. L'injection de thrombine est suivie par une phase de dissociation en tampon, puis par une étape de régénération obtenue en injectant une solution NaCl 1 M pendant 8 min. **(A)** Biopuce réalisée avec une chimie polypyrrole (concentration des sondes dans la solution de dépôt : 20  $\mu\text{M}$ ). **(B)** Biopuce réalisée avec une chimie thiol (concentration des sondes dans la solution de dépôt : 20  $\mu\text{M}$  + PEG 10  $\mu\text{M}$ ).

Nous observons tout d'abord que le signal obtenu est dans les deux cas plus élevé pour les plots APT1, ce qui concorde avec la plupart des résultats de la littérature. Dans le cas de la chimie thiol la différence de signal est moins importante, mais ce ne fut pas toujours le cas au cours des différentes expériences menées : cet écart a en effet tendance à augmenter au fur et à mesure du vieillissement de la puce, l'amplitude maximale des signaux des plots APT2 diminuant plus rapidement que celle des plots APT1.

Nous remarquons également que le profil des signaux est bien similaire pour les deux chimies de greffage mais que l'amplitude est plus élevée dans le cas de la chimie thiol (le signal s'équilibre autour de 4 % de variation de réflectivité pour APT1 sur les biopuces à chimie thiol contre un peu plus de 2 % sur celles à chimie polypyrrole). Cela rejoint les résultats obtenus lors de la première étape de caractérisation des biopuces par injection des séquences complémentaires (**Figure 2.5**) et appuie donc l'hypothèse d'une meilleure accessibilité des sondes lors de la formation de SAMs mixtes sur la puce. De plus, il est important de noter que les signaux représentés ici sont issus d'une seule expérience mais que d'autres furent réalisées sur différentes biopuces et à différents moments au cours de ce travail de thèse, et que des variations de réponse furent observées entre des biopuces élaborées selon le même protocole. Il fut en particulier remarqué que la variabilité des signaux observés entre des biopuces fraîchement fabriquées était beaucoup plus importante pour celles réalisées par chimie polypyrrole (malgré une bonne caractérisation systématique pour les injections des séquences complémentaires). Ceci peut sûrement en partie s'expliquer par l'importance du repliement des séquences aptamères pour la reconnaissance de leur cible, repliement qui peut être défavorisé par la conformation plus enchevêtrée du polymère en cas d'électropolymérisation du pyrrole, comparé à l'assemblage ordonné attendu de la formation des SAMs. L'hybridation des séquences complémentaires dépendant beaucoup moins du repliement de l'aptamère, il est ainsi normal que les signaux d'hybridation soient, eux, plus reproductibles. Pour toutes ces raisons (signaux moins élevés et moins reproductibles), la chimie polypyrrole fut abandonnée au profit de la chimie thiol, une fois le protocole de formation des SAMs optimisé.

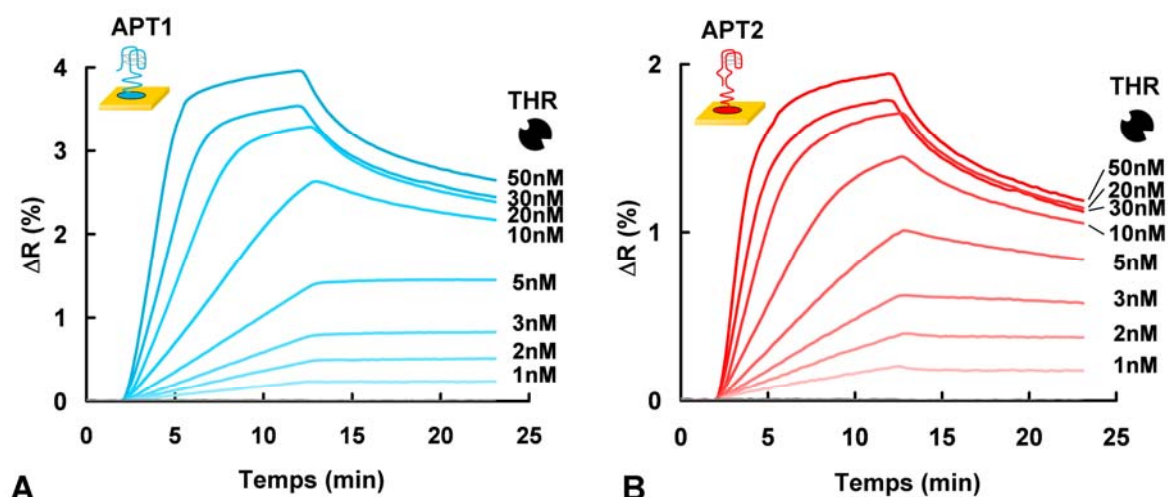
La figure suivante (**Figure 2.12**) présente les résultats obtenus sur une biopuce (chimie thiol) lors d'injections longues successives de thrombine à différentes concentrations (de 50 à 5 nM). Deux catégories de plots sont représentés : les plots à « forte densité de greffage » (solutions de dépôt réalisées avec 20  $\mu\text{M}$  de sondes et 10  $\mu\text{M}$  de PEG) et les plots à « faible densité de greffage » (solutions de dépôt réalisées avec 10  $\mu\text{M}$  de sondes et 10  $\mu\text{M}$  de PEG).



**Figure 2.12** Série d'injections longues de thrombine à différentes concentrations (50 – 20 – 10 – 5 nM). Chaque courbe correspond à la moyenne des signaux obtenus sur 3 réplicats. Les courbes foncées représentent les plots à forte densité de greffage (réalisés à partir des solutions de dépôt concentrées à 20  $\mu$ M en éléments sondes), les courbes claires, les plots à plus faible densité de greffage (réalisés à partir des solutions de dépôt concentrée à 10  $\mu$ M en éléments sondes). Entre chaque injection de thrombine, la puce est régénérée avec une solution NaCl 1 M. Les flèches indiquent que la boucle de 1 mL a été rechargée afin de pouvoir prolonger l'injection.

Comme nous pouvions nous y attendre, les signaux sont plus élevés pour les plots à plus forte densité. De plus, même si nous observons une légère dérive du signal de l'or, le signal non spécifique détecté sur les plots Zip9 (faible et forte densité) est très faible et le rapport signal/bruit de détection de la thrombine est donc très élevé y compris pour la concentration la plus basse testée dans cette gamme (5 nM). D'un autre côté, nous remarquons que, si le niveau d'équilibre ne baisse que faiblement lorsque la concentration en thrombine décroît, le temps que met le signal à atteindre ce niveau d'équilibre augmente très fortement : pour les concentrations les plus faibles il est alors nécessaire de recharger la boucle en cours d'injection afin de pouvoir la prolonger jusqu'à quasiment 200 min pour l'injection 5 nM, sans réussir à atteindre réellement le plateau pour les plots à densité plus élevée.

D'autres types d'injections ont été réalisées pour des gammes de concentrations plus complètes : des injections courtes, de moins de 15 min à débit 50  $\mu$ L/min, en présence d'un large excès de protéine ballaste (cytochrome c) 500 nM. Ce ballaste est ajouté afin de prévenir l'adsorption de la thrombine sur les parois du circuit et du matériel de préparation (tubes Eppendorf) lorsqu'elle n'est présente qu'à faible concentration (quelques nanomolaires ou moins) et a permis également de vérifier la très bonne spécificité du signal : la détection de la thrombine n'est aucunement perturbée par l'ajout d'une autre protéine dans le milieu de détection, même à un ratio aussi élevé que 500 : 1 (**Figure 2.13**).



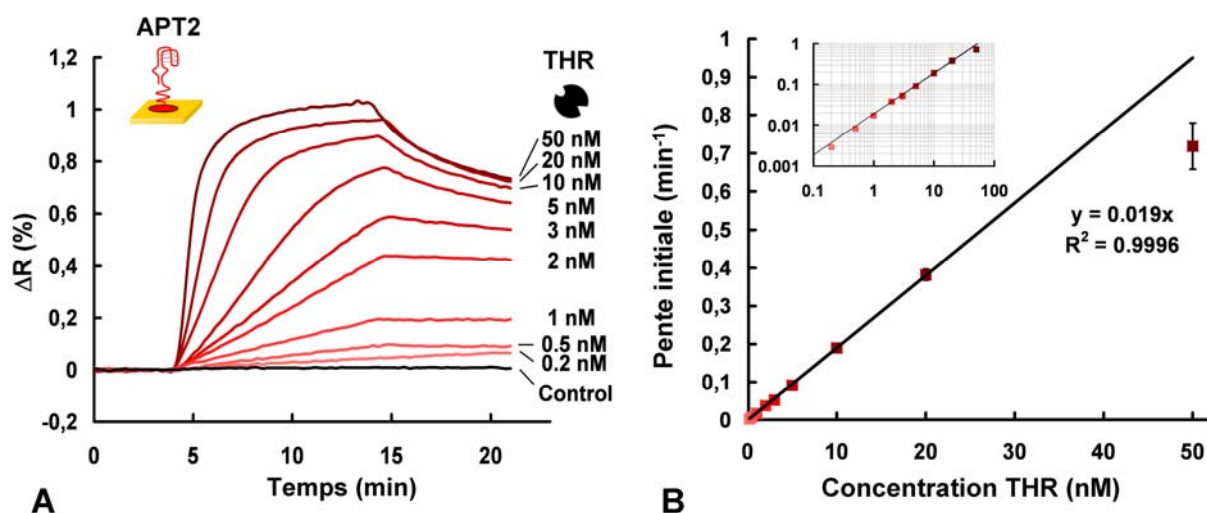
**Figure 2.13** Sensogrammes obtenus sur les plots APT1 (A) et les plots APT2 (B) à partir d'injections courtes de thrombine à différentes concentrations (50 – 30 – 20 – 10 – 5 – 3 – 2 – 1 nM) toujours co-injectée avec une concentration fixe (500 nM) de cyt c. Chaque courbe représente la moyenne des signaux obtenus sur 3 réplicats de plots forte densité, corrigés par le signal d'un plot contrôle Zip7. La moyenne des plots contrôles lors de l'injection 1 nM est représentée en gris mais est confondue avec l'axe des abscisses.

A nouveau on remarque que ce temps réduit d'injection ne permet pas d'atteindre le signal d'équilibre du système dès que la concentration est inférieure à 20 nM.

### 2.3.2 Détection cinétique et courbe d'étalonnage

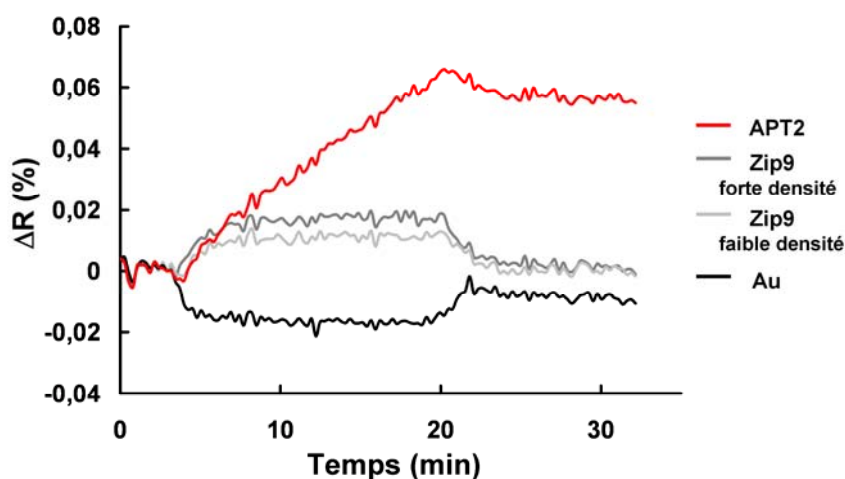
De façon intéressante, l'exploitation des données cinétiques des injections réalisées aux temps courts a permis d'obtenir de bien meilleures performances que le signal d'équilibre ne laisse présager (en particulier car le temps nécessaire pour obtenir ce signal finit par dépasser plusieurs heures). Le caractère temps réel de la technique SPR s'illustre ainsi particulièrement car il permet d'obtenir ces cinétiques d'interaction, chose que ne permet évidemment pas la plupart des techniques de détection « en point final » basées sur une lecture unique du signal, réalisée habituellement lorsque l'état d'équilibre du système est supposé atteint.

C'est ainsi qu'une courbe de calibration très précise des signaux SPR en fonction de la concentration de thrombine fut obtenue à partir des valeurs calculées de la pente à l'origine des signaux détectés lors des injections de thrombine à différentes concentrations (de 0,2 à 50 nM), tracées en fonction de la concentration de thrombine injectée (**Figure 2.14**). La pente initiale des signaux est calculée après la correction par le signal d'un plot contrôle qui permet d'éliminer tout signal non spécifique, sur les premières minutes de l'injection (les premières dizaines de secondes ne sont pas considérées afin d'assurer le remplissage complet de la chambre de réaction par la solution contenant la thrombine).



**Figure 2.14** Performances du biocapteur à thrombine. (A) Sensogrammes obtenus sur les plots APT2 à partir d'injections courtes de thrombine à différentes concentrations (50 – 20 – 10 – 5 – 3 – 2 – 1 – 0,5 – 0,2 nM). Chaque courbe représente la moyenne des signaux obtenus sur 3 réplicats de plots faible densité, corrigés par le signal d'un plot contrôle Zip9. La courbe contrôle représente la moyenne des signaux obtenus sur tous les plots contrôles lors de l'injection 0,2 nM. (B) Courbe d'étalonnage du biocapteur réalisée à partir des pentes à l'origine des sensogrammes de gauche, représentées en fonction de la concentration en thrombine [THR] injectée. La droite en noir correspond à la régression linéaire réalisée sur ces points. Encadré : représentation logarithmique des mêmes résultats.

Un détail de l'injection un peu plus longue (15 min), à la plus faible concentration testée (0,2 nM), est représenté sur la **Figure 2.15**. Malgré un signal relativement faible ( $< 0,1$  %), on constate, sans aucun doute possible, la spécificité du signal sur les plots aptamères.



**Figure 2.15** Détail de l'injection 0,2 nM. Chaque courbe représente la moyenne des signaux obtenus sur 3 réplicats, corrigés par le signal d'un plot contrôle Zip9 faible densité.

### 2.3.3 Avantages et performances

La courbe de calibration représentée sur la **Figure 2.14**, réalisée à partir des résultats obtenus sur les plots APT2 faible densité (des résultats comparables sont obtenus en analysant

les courbes des plots à forte densité et des plots APT1) permet de qualifier notre biopuce de la façon suivante :

- Une large gamme linéaire de quantification de la thrombine de 2 ordres de grandeur : de 0,2 à 20 nM, sans besoin d'étape supplémentaire d'amplification.
- Une quantification précise (erreur relative  $\Delta c/c < 5 \%$ ) sur toute la gamme de quantification.
- Une limite de détection (calculée en multipliant par 3 la déviation standard de la pente enregistrée sur les plots contrôles) sub-nanomolaire de 100 pM.
- Un temps d'analyse considérablement réduit ( $< 10$  min) vu que seules les premières minutes de l'injection sont nécessaires au calcul de la pente à l'origine et donc à la détermination de la concentration de la protéine en solution.

Sans pouvoir rivaliser avec les performances annoncées de biocapteurs basés sur une amplification de signal (fluorescence, électrochimie) qui n'est pas réalisée dans notre cas, le protocole de détection mis au point dans cette étude a permis d'obtenir des performances meilleures ou comparables à toutes celles obtenues par SPR (**Tableau 2.1**). En particulier la limite de détection (100 pM) associée à une gamme linéaire de quantification de 2 ordres de grandeur n'avait pas été obtenue jusque-là sans l'emploi d'une technique d'amplification additionnelle (basée sur la fonctionnalisation de nanobilles).

Il n'est évidemment pas exclu que l'ajout de cette étape d'amplification à notre protocole permettrait d'améliorer encore ces performances.

La preuve de concept de la pertinence du couplage de la SPRi avec les aptamères pour la détection de protéines à des concentrations subnanomolaires, en temps réel et sans aucun marquage est donc faite. Cependant, il reste important de noter que cette preuve de concept est pour l'instant réalisée dans un milieu simple constitué de tampon, chargé avec une protéine ballaste cyt c 500 nM. En l'état, rien ne garantit donc que ces performances soient maintenues dans un milieu plus complexe, d'intérêt biologique beaucoup plus pertinent, tel que le sang. Il est probable que de nombreuses optimisations soient nécessaires pour cela. Malgré tout, la biopuce mise au point ici constitue déjà un outil très performant d'étude de la protéine cible, la thrombine. Cet outil peut d'ores et déjà permettre de mieux caractériser et analyser la thrombine et en particulier ses interactions avec différents éléments, comme nous le verrons dans toute la suite de ce manuscrit.

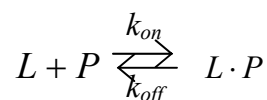
Pour commencer, comme certaines des études SPR précédentes qui s'y étaient risquées avant nous, nous avons dans un premier temps cherché à déterminer la valeur de la constante d'affinité caractérisant les interactions entre la thrombine et ses aptamères. Cette question fait ainsi l'objet de la dernière section de ce chapitre.

## 2.4 Détermination des $K_D$

### 2.4.1 Définition et détermination du $K_D$

La constante de dissociation à l'équilibre,  $K_D$ , est une constante très souvent utilisée pour décrire l'affinité entre un ligand  $L$  et une protéine  $P$ , *i.e.* la force de l'interaction entre la protéine et son ligand. Les affinités entre protéines et ligands dépendent des liaisons non covalentes qui s'établissent entre les deux molécules, qui peuvent être des liaisons de nature électrostatique, hydrophobe, des liaisons hydrogène, etc.

L'interaction réversible entre ces deux molécules peut être décrite comme suit :



où  $L \cdot P$  désigne le complexe créé par la protéine liée au ligand,  $k_{on}$  la constante cinétique d'association de la réaction et  $k_{off}$  sa constante cinétique de dissociation. Les unités de ces constantes sont respectivement  $M^{-1}.s^{-1}$  et  $s^{-1}$  et interviennent dans la formule des vitesses d'association (nombre de phénomène de liaison par unité de temps) et de dissociation (nombre de phénomène de dissociation par unité de temps) selon le modèle de la loi d'action de masse :

$$\begin{aligned} v_a &= k_{on} [L][P] \\ v_d &= k_{off} [L \cdot P] \end{aligned}$$

avec  $[X]$  désignant la concentration de la molécule  $X$  en solution.

A l'équilibre du système, ces deux vitesses sont égales si bien qu'il y a un nombre fixe de protéine et de ligand sous forme complexée et l'on obtient :

$$k_{on} [L][P] = k_{off} [L \cdot P]$$

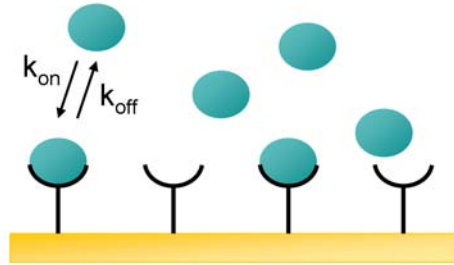
Si l'on considère le quotient des deux constantes cinétiques  $k_{off}$  et  $k_{on}$  on obtient la constante de dissociation à l'équilibre :

$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}} = \frac{[L][P]}{[L \cdot P]}$$

Cette dernière constante s'exprime en  $M$  ou  $mol.L^{-1}$  (elle est donc homogène à une concentration) et varie en sens inverse de l'affinité : plus l'affinité entre la protéine et son ligand est forte, plus le  $K_D$  est faible (en pratique très rarement en dessous du picomolaire).

De plus cette constante a l'avantage d'exprimer directement la concentration de ligand ou de protéine pour laquelle la moitié de l'autre espèce sera sous forme complexée lorsque l'équilibre du système sera atteint. En effet si  $[L] = K_D$  alors  $[P] = [L \cdot P]$  (il y a autant de protéines libres que de protéines complexées) et inversement si  $[P] = K_D$  alors  $[L] = [L \cdot P]$  (il y a autant de ligands libres que de ligands complexés).

Le fait que la technique SPRi, en nous donnant accès aux informations cinétiques de l'interaction, peut permettre la détermination de cette constante a déjà été évoqué. Cependant la situation est alors légèrement différente : le ligand (ou la protéine) se trouve dans ce cas immobilisé sur une surface. Ce nouveau système peut être éventuellement décrit par le modèle de Langmuir (**Figure 2.16**).



**Figure 2.16** Schéma de l'adsorption de Langmuir. Les molécules peuvent s'adsorber sur les sites inoccupés de la surface. Le taux de recouvrement de la surface est caractérisé par  $\theta$  représentant la fraction de sites occupés.

Dans ce modèle il est utile de considérer  $\theta = \text{nombre de sondes (ligands) occupées} / \text{nombre total de sondes accessibles à la surface}$ , assimilable à la fraction  $\frac{[L \cdot P]}{[L] + [L \cdot P]}$  du modèle précédent. En effectuant plusieurs hypothèses, détaillées par la suite, on obtient alors l'isotherme d'adsorption de Langmuir :

$$\theta_{eq} = \frac{[P]}{(K_D + [P])}$$

où  $\theta_{eq}$  correspond à la valeur de  $\theta$  à l'équilibre.

Les signaux SPRi obtenus à l'équilibre (variation de réflectivité  $\Delta R_{eq}$ ) lors d'injections de protéine à concentration connue constante  $[P]$  peuvent ainsi servir à déterminer le  $K_D$ . En effet on peut considérer que ce signal est proportionnel à la masse, et donc au nombre, de protéines liées à la surface. Le nombre total de sondes accessibles à la surface peut lui aussi être estimé. A très forte concentration de protéine injectée, on considère que toutes les sondes sont occupées : le nombre de protéines liées est donc égal au nombre de sondes accessibles, et ce nombre maximum de protéines est alors lui-même toujours proportionnel au signal maximum de saturation enregistré à l'équilibre lors des injections de protéine à très forte concentration ( $\Delta R_{max}$ ). On a donc :

$$\theta_{eq} = \frac{\Delta R_{eq}}{\Delta R_{max}}$$

Ainsi le tracé de  $\Delta R_{eq}$  en fonction de la concentration de protéine injectée  $[P]$  permet la détermination du  $K_D$  en utilisant un fit de Langmuir non linéaire :

$$\Delta R_{eq} = \Delta R_{max} \frac{[P]}{(K_D + [P])}$$



Cependant ce modèle repose sur quelques hypothèses parmi lesquelles figurent :

- Toutes les sondes (ligands) doivent être identiques et équivalentes (en particulier dans le cas des aptamères, le repliement doit être identique)
- Chaque ligand ne peut interagir qu'avec une molécule cible uniquement.
- Chaque cible ne peut interagir qu'avec une molécule sonde uniquement (la protéine ne peut interagir avec deux ligands adjacents en même temps).
- Il n'y a pas d'interaction compétitive en solution (la protéine ne peut pas interagir avec elle-même ou avec un autre ligand présent en solution)
- Le greffage des sondes doit être suffisamment dilué pour éviter tout effet d'interaction inter-sondes (encombrement, interactions électrostatiques).

C'est en particulier la première et la dernière condition qui sont les plus limitantes : en pratique on comprend facilement qu'elles ne sont jamais complètement réalisées. Comme on l'a déjà évoqué, la densité de greffage est difficilement mesurable et contrôlable précisément et il est alors évident qu'il est difficile de s'affranchir des effets de surface lors du calcul du  $K_D$  (inhomogénéité du greffage (O'Shannessy 1996; Vijayendran 2001; Rao 2012), mauvaise accessibilité de la sonde (Steel 2000), influence de la distance entre les sondes (Rinker 2008)). Toutes ces raisons font que la constante de dissociation  $K_D$  déterminée à la surface d'un biocapteur par application du modèle de Langmuir est bien souvent différente de ce qu'elle serait en solution ( $K_D^{\text{surf}} \neq K_D^{\text{sol}}$ ).

Par exemple, dans le cas de puces à ADN, un écart de plus de 10 ordres de grandeur a déjà été observé entre la constante d'affinité en solution et celle à la surface d'une biopuce pour l'hybridation de brins complémentaires (Levicky 2005). Dans le cas du criblage d'une banque de ligands, le classement des candidats en fonction de leur affinité pour une protéine cible a même déjà pu être renversé, selon que l'affinité soit mesurée en solution ou à la surface d'une biopuce à protéine (Nieba 1996). La grande variabilité des valeurs de  $K_D$  que l'on trouve dans la littérature pour caractériser des affinités entre protéines et aptamères semble suggérer que l'immobilisation sur une surface (biocapteurs, biopuces, membranes, billes...) de l'une des deux molécules influence grandement l'affinité entre les deux molécules (Wolf 2007), même si aucune étude précise et quantitative n'a encore mesuré l'effet de la densité de greffage.

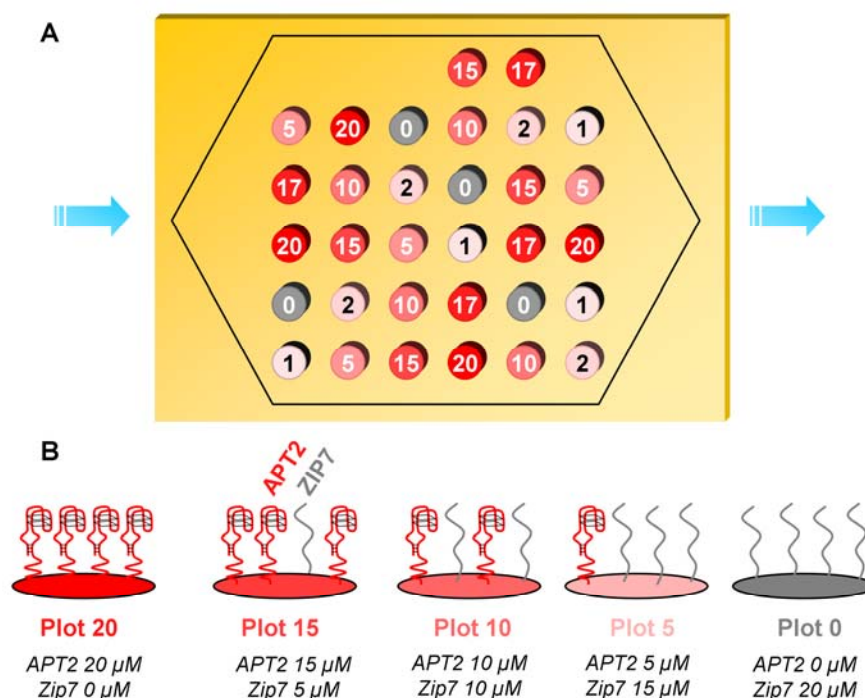
C'est donc ce qui a été tenté ici, à travers l'étude de l'affinité de la thrombine pour APT2. Pour cela, le  $K_D$  a été déterminé à la surface de la biopuce pour différentes densités de greffage grâce à l'application du modèle de Langmuir et au contrôle strict de la densité de greffage sur les biopuces. Une méthode a ensuite été mise au point pour déterminer le  $K_D$  en solution, de manière indépendante, et le comparer aux valeurs de surface.

## 2.4.2 Le $K_D$ de surface

Afin d'évaluer l'influence de la densité de greffage sur la détermination du  $K_D$ , il a tout d'abord fallu élaborer des biopuces à densité de greffage variable et contrôlée. Le marquage radioactif des sondes a montré que la densité de greffage obtenue sur la puce 1) n'était pas

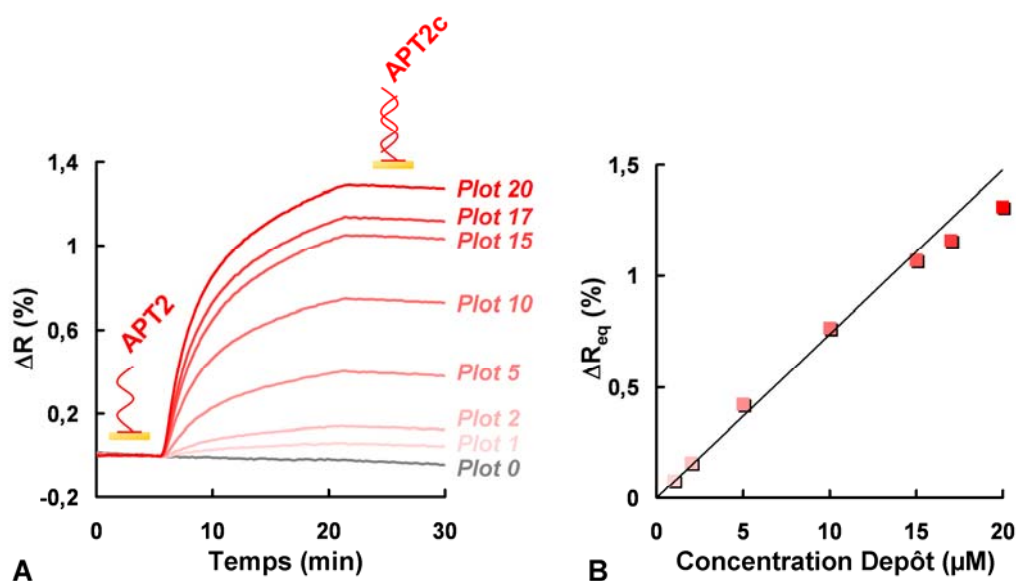
proportionnelle à la concentration en sonde présente dans la solution de greffage et 2) saturait probablement vers une valeur proche de  $8 \text{ pmol/cm}^2$  dès que la concentration en sonde atteignait les  $20 \text{ }\mu\text{M}$ .

L'idée a donc été de se placer à cette concentration en sonde de saturation de  $20 \text{ }\mu\text{M}$  (d'autant que nous avons déjà démontré qu'elle permettait d'obtenir d'excellentes performances de détection de la thrombine) et de mélanger deux sondes dans la solution de dépôt : la première étant évidemment APT2, la seconde étant une sonde complètement insensible à la présence de thrombine, Zip7. En faisant varier la proportion des deux espèces, il fut alors possible d'obtenir une densité de greffage d'APT2 contrôlée (**Figure 2.17**).



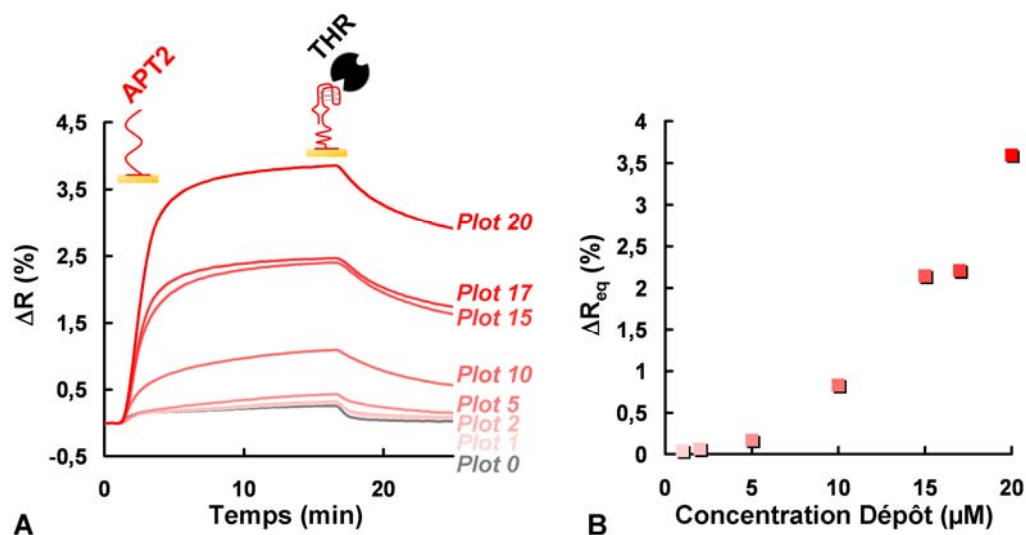
**Figure 2.17** Figure de principe du contrôle de la densité de greffage à partir d'un co-mélange de sondes APT2 et Zip7 sur les plots. Les solutions de dépôt contiennent une concentration totale en sonde identique de  $20 \text{ }\mu\text{M}$  alors que la concentration relative des sondes APT2 et Zip7 varie. **(A)** Plan de dépôt des biopuces réalisées à partir de ce principe. Le numéro inscrit sur les plots correspond à la concentration des sondes APT2 présente dans la solution de dépôt. Les flèches bleues indiquent le sens du flux. **(B)** Représentation schématique de la composition en sonde de quelques plots.

Afin de vérifier que le rapport présent en solution entre les deux espèces était bien conservé à la surface, la première étape de caractérisation des biopuces *via* l'injection de la séquence complémentaire d'APT2 fut réalisée. La proportionnalité du signal d'hybridation a alors permis de confirmer la maîtrise de la densité de greffage d'APT2 (**Figure 2.18**).



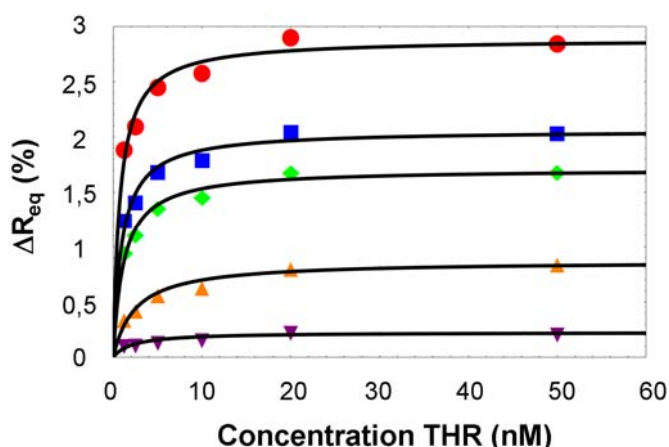
**Figure 2.18** Résultats d'hybridation de la séquence complémentaire d'APT2 (APT2c) sur les biopuces à densité contrôlée. **(A)** Signaux obtenus lors de l'injection APT2c 500 nM. Chaque courbe représente la moyenne des signaux obtenus sur 4 réplicats, corrigés par le signal d'un plot d'or nu. **(B)** Tracé de la valeur de réflectivité à l'équilibre ( $t = 20$  min), corrigée par celle du plot 0, en fonction de la concentration en sonde APT2 dans la solution de dépôt. Le tracé de la droite en noir permet de vérifier la proportionnalité du signal.

*A contrario*, la première injection de thrombine 50 nM réalisée sur la puce permet immédiatement de constater l'absence d'une relation de proportionnalité entre le signal de détection de la thrombine et la densité de greffage (**Figure 2.19**).



**Figure 2.19** Résultats de l'interaction thrombine-APT2 sur les biopuces à densité contrôlée. **(A)** Signaux obtenus lors de l'injection THR 50 nM. Chaque courbe représente la moyenne des signaux obtenus sur 4 réplicats, corrigés par le signal d'un plot d'or nu. **(B)** Tracé de la valeur de réflectivité à l'équilibre ( $t = 16$  min) corrigée par celle du plot 0, en fonction de la concentration en sonde APT2 dans la solution de dépôt.

Enfin, le but étant de déterminer le  $K_D$ , des injections longues de thrombine à concentration variable (de 1,25 nM à 50 nM) furent ensuite réalisées jusqu'à la stabilisation du signal au niveau d'équilibre du système. L'isotherme d'adsorption fut alors ajusté avec le modèle de Langmuir sur les courbes représentant la valeur du signal obtenu à l'équilibre en fonction de la concentration en thrombine injectée (**Figure 2.20**).



**Figure 2.20** Interaction de la thrombine avec APT2 mesurée à l'équilibre sur les plots correspondant à différentes densités de greffage évaluée en fonction de la concentration de thrombine injectée (de 1,25 nM à 50 nM). Du bas vers le haut les densités de greffage sont respectivement 2 (Plot 5), 4 (Plot 10), 6 (Plot 15), 6,8 (Plot 17) et 8 (Plot 20) pmol/cm<sup>2</sup>. Chaque point correspond à la moyenne des signaux obtenus sur 4 réplicats corrigés par le signal d'un plot contrôle (Plot 0). Les isothermes de Langmuir sont représentés par les courbes noires.

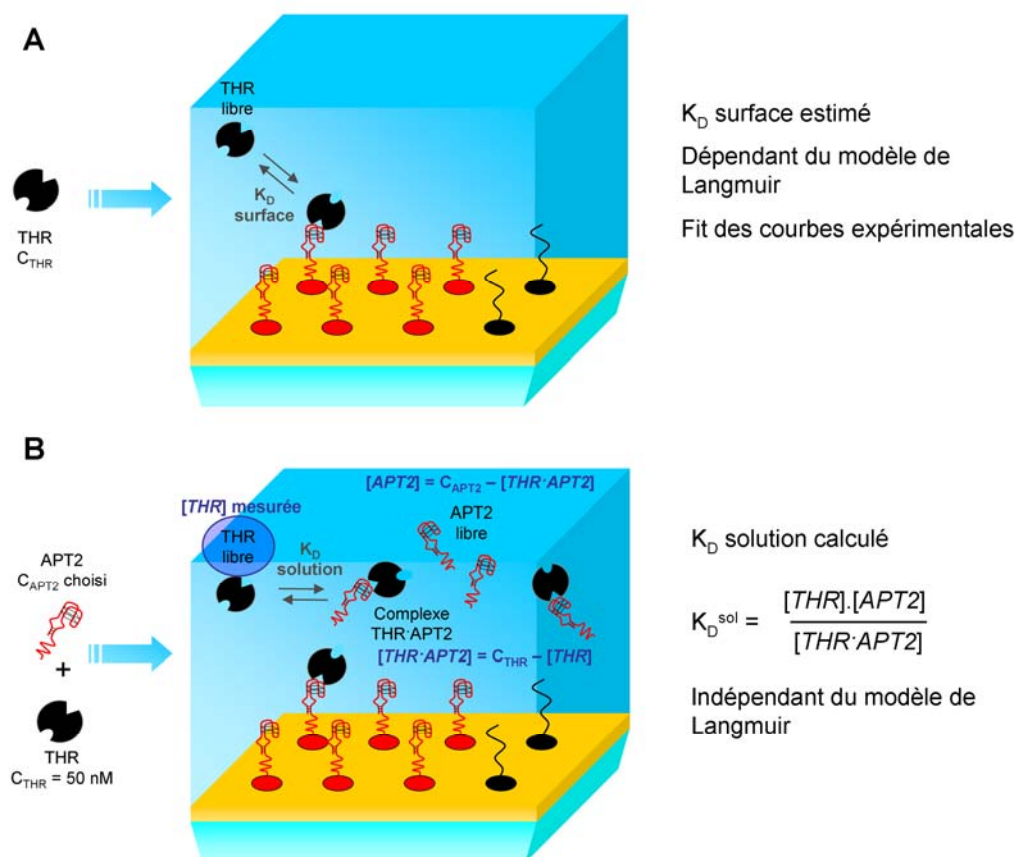
Les valeurs de  $K_D$  extraites des isothermes de Langmuir sont indiquées dans le tableau ci-dessous (**Tableau 2.3**) :

| $\sigma$ (en pmol/cm <sup>2</sup> ) | $K_D^{\text{surf}}$ (en nM) |
|-------------------------------------|-----------------------------|
| 2                                   | 2,26 ± 0,06                 |
| 4                                   | 2,45 ± 0,11                 |
| 6                                   | 1,18 ± 0,03                 |
| 6,8                                 | 0,97 ± 0,14                 |
| 8                                   | 0,77 ± 0,03                 |

**Tableau 2.3** Détermination des constantes de dissociation  $K_D^{\text{surf}}$  de l'interaction entre APT2 et la thrombine en fonction de la densité de greffage d'APT2. L'erreur exprimée correspond à la variation de valeurs obtenue sur 4 réplicats d'une même biopuce. Les valeurs sont issues des isothermes de Langmuir (**Figure 2.20**).

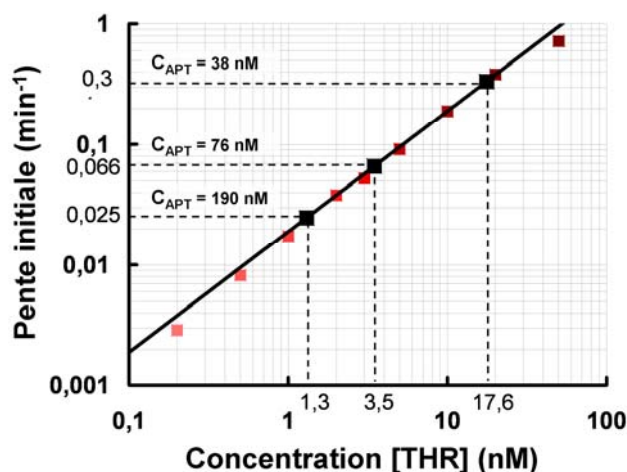
### 2.4.3 Le $K_D$ en solution

Le principe du calcul du  $K_D$  en solution repose sur l'utilisation de la biopuce pour quantifier la présence de thrombine libre en solution durant des essais de compétition mis en place *via* l'injection simultanée de thrombine et de molécules d'APT2. Le principe de cette méthode est récapitulé sur la **Figure 2.21**.



**Figure 2.21** Figure de principe du calcul du  $K_D$  en solution. **(A)** Récapitulatif du principe de l'estimation du  $K_D$  en surface. L'estimation est réalisée à partir des valeurs d'équilibre des signaux obtenus lors de l'injection de thrombine seule à différentes concentrations. Ces valeurs sont analysées suivant un modèle de Langmuir. Le  $K_D$  obtenu dépend ainsi du modèle utilisé. **(B)** Schéma du principe de la méthode de calcul du  $K_D$  en solution. Des co-injections de thrombine (50 nM) et d'APT2 (concentration variable mais connue) sont réalisées sur la biopuce. Dans la solution injectée se trouve ainsi un équilibre de thrombine libre, APT2 libre et thrombine complexée avec une molécule d'APT2. Cet équilibre est caractérisé par le  $K_D$  que l'on souhaite déterminé. Le signal obtenu sur la biopuce en début d'injection nous renseigne sur la concentration de thrombine libre présente en solution. On en déduit alors les concentrations de complexe thrombine-APT2 et d'APT2 libre. Ces valeurs permettent de calculer le  $K_D$  de façon indépendante du modèle de Langmuir et des interactions se déroulant à la surface.

La thrombine fut ainsi incubée à une concentration fixe ( $C_{THR} = 50 \text{ nM}$ ) avec une concentration variable d'APT2 ( $C_{APT2} = 38, 45, 76, 90$  et  $190 \text{ nM}$ ) en solution avant d'être injectée sur la biopuce. La mesure de la concentration en thrombine libre  $[THR]$  présente en solution fut ensuite réalisée grâce au report de la pente initiale du signal détecté sur les plots APT2 lors de ces co-injections sur la courbe d'étalonnage de la biopuce (**Figure 2.22**)



**Figure 2.22** Valeur des pentes à l'origine enregistrées lors des co-injections de thrombine ( $C_{THR} = 50$  nM) et d'APT2 ( $C_{APT2} = 38, 76$  ou  $190$  nM) reportées sur la courbe de calibration de la **Figure 2.14**. La concentration de thrombine libre  $[THR]$  est ainsi déterminée.

Le calcul du  $K_D$  de l'interaction thrombine-APT2 est alors possible :  $K_D = \frac{[THR][APT2]}{[THR \cdot APT2]}$

Avec  $[THR \cdot APT2] = C_{THR} - [THR]$ , la concentration de thrombine liée à APT2 dans la solution à l'équilibre, et  $[APT2] = C_{APT2} - [THR \cdot APT2]$ , la concentration d'APT2 libre en solution.

Les valeurs de  $K_D^{sol}$  déterminées par cette méthode à partir des différentes concentrations totales d'aptamères injectées ( $C_{APT2}$ ) et pour les deux densités de greffage différentes présentes sur la biopuce (« faible densité » correspondant à la présence de  $10 \mu M$  de sonde APT2 dans la solution de dépôt et « forte densité » correspondant à la présence de  $20 \mu M$  de sonde APT2) sont présentées dans le **Tableau 2.4**. Même si des variations parfois importantes sont observables, ces valeurs restent consistantes entre elles et le calcul de la valeur  $p$  entre les deux séries correspondant à chaque densité de greffage (valeur  $p = 0,37$ ) permet de vérifier que ces valeurs ne sont pas significativement différentes. De plus la valeur moyenne  $K_D^{sol} = 3,16 \pm 1,16$  nM calculée est en très bon accord avec la dernière valeur de  $K_D$  en solution, déterminée par interférométrie rétrodiffusée BSI (*Back-Scattering Interferometry*), publiée récemment dans la littérature  $K_D = 3,84 \pm 0,68$  nM (Olmsted 2011). Ceci confirme la capacité de notre méthode à déterminer correctement le  $K_D$  en solution des interactions protéine-aptamère.

| $c_{\text{APT2}}$ (en nM) | $K_D^{\text{sol}}$ (en nM) |                           |
|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
|                           | Faible densité de greffage | Forte densité de greffage |
| 38                        | $3,08 \pm 0,62$            | $3,83 \pm 0,40$           |
| 45                        | $4,94 \pm 0,22$            | $4,70 \pm 1,27$           |
| 76                        | $2,19 \pm 0,04$            | $1,67 \pm 0,07$           |
| 90                        | $2,05 \pm 0,20$            | $2,46 \pm 0,29$           |
| 190                       | $2,88 \pm 0,12$            | $3,77 \pm 0,09$           |

**Tableau 2.4** Détermination de la constante de dissociation  $K_D^{\text{sol}}$  de l'interaction entre APT2 et la thrombine en solution à partir de différentes concentrations d'aptamère APT2 co-injecté ( $c_{\text{APT2}} = 38, 45, 76, 90$  et  $190$  nM) et sur différents plots APT2 (faible et forte densité de greffage). Chaque valeur correspond à la moyenne réalisée sur 3 réplicats  $\pm$  écart-type. Les valeurs données pour les injections respectives  $c_{\text{APT2}} = 38, 76$  et  $190$  nM et  $c_{\text{APT2}} = 45$  et  $90$  nM furent réalisées sur deux biopuces, caractérisées indépendamment.

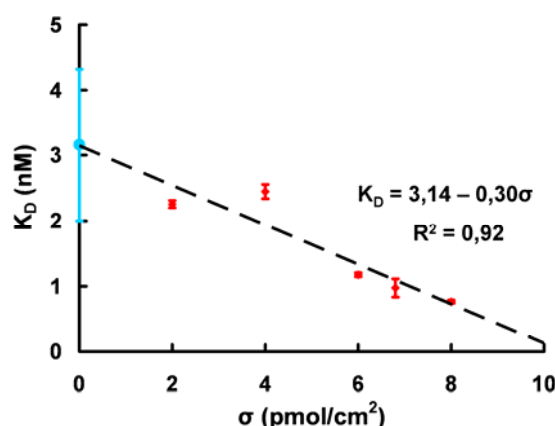
#### 2.4.4 Discussion sur $K_D^{\text{surf}}$ vs $K_D^{\text{sol}}$

La dépendance établie ici du  $K_D$  de surface déterminé d'après le modèle de Langmuir vis-à-vis de la densité de greffage est significative de la difficulté d'obtenir une valeur consensus pour l'interaction entre une protéine et un aptamère. En particulier dans le cas des aptamères APT1 et APT2 largement présents dans la littérature, les valeurs annoncées peuvent varier de plusieurs ordres de grandeur selon la technique de détection utilisée. Pour APT2 on trouve ainsi des valeurs aussi différentes que  $0,5$  nM, valeur annoncée dans la publication de sélection de l'aptamère par une méthode de rétention sur filtres de nitrocellulose (Tasset 1997), à presque  $100$  nM trouvée par d'autres techniques d'analyse SPR (Lin 2011), voire même  $255$  nM d'après une étude d'électrophorèse capillaire (Li Y 2008).

La variabilité de valeurs rencontrées dans la littérature s'explique par la sensibilité de cette constante aux conditions expérimentales propres aux techniques employées pour la déterminer (composition et température du tampon, marquage éventuel d'un des deux partenaires ou immobilisation nécessaire du ligand).

Le biocapteur cinétique mis au point lors de notre étude a permis de comparer la valeur de cette constante déterminée en solution, *via* une méthode indépendante du modèle de Langmuir, aux valeurs déterminées à la surface du biocapteur (sur des plots à densité de greffage variable) dans des conditions expérimentales par ailleurs identiques. Ces valeurs sont différentes de façon significative et comme on le voit sur la **Figure 2.23**, la dépendance de  $K_D^{\text{surf}}$  pour la densité de greffage s'extrapole linéairement jusqu'à la valeur de  $K_D^{\text{sol}}$  lorsque la densité de greffage diminue.





**Figure 2.23** A faible densité de greffage ( $\sigma$ ), les valeurs de  $K_D$  de surface (en rouge) déterminées au paragraphe 2.4.2 s'extrapolent de façon linéaire jusqu'à la valeur du  $K_D$  en solution (en bleu) déterminée au paragraphe 2.4.3.

Cette extrapolation linéaire suggère qu'un effet coopératif existe à la surface (se traduisant par une diminution du  $K_D$  apparent) et que cet effet s'intensifie à mesure que la densité de greffage de l'aptamère augmente. A très faible densité de greffage l'effet disparaît et le  $K_D$  de surface semble alors rejoindre la valeur déterminée en solution. Ceci laisse penser que l'immobilisation de l'aptamère dans les conditions d'immobilisation réalisées ne gêne pas l'interaction ultérieure avec la thrombine : l'effet perturbateur de la surface semble négligeable face aux interactions inter-sondes ou inter-cibles probablement à l'origine de l'effet coopératif détecté. Nul doute que la formation de SAMs mixtes avec l'ajout des PEG dans la solution de dépôt contribue très fortement à ce résultat, tout comme l'incorporation d'un bras espaceur suffisant sur les sondes assure sans doute une flexibilité suffisante aux aptamères pour reconnaître la thrombine, au moins aussi efficacement qu'en solution.

## 2.5 Conclusion

Nous avons exposés dans ce chapitre un aperçu des performances atteintes par les biopuces imaginées et élaborées au cours de ce travail de thèse pour la détection de la thrombine. Les avantages qui font de notre biopuce un biocapteur à la pointe des résultats trouvés dans la littérature sont 1) une large gamme linéaire de quantification de la thrombine libre en solution (de 0,2 à 20 nM), pertinente en regard des concentrations de thrombine présentes dans le sang dans le cas d'individus sains ou malades, 2) une limite de détection sub-nanomolaire (100 pM) sans étape d'amplification nécessaire, 3) l'accès aux données cinétiques des interactions qui ont permis d'exploiter l'état hors équilibre du système et de réduire ainsi le temps de détection à moins de 10 min et 4) le caractère multiplexable de la détection grâce à l'emploi de la technique SPRi comme technique de détection.

Il reste cependant important de préciser que ces performances n'ont été obtenues que dans le cas d'une détection en milieu tamponné simplement chargé en cytochrome c. Nous sommes donc encore assez loin d'une application biomédicale directe qui consisterait à détecter la



thrombine dans un milieu d'analyse bien plus complexe que notre tampon de course : le sang. Malgré cela, cette biopuce constitue déjà un outil performant qui peut être utilisé comme plateforme d'étude de l'interaction de la thrombine avec les aptamères.

La dernière partie de ce chapitre fut en particulier consacrée à la description de la méthode utilisée pour déterminer la constante de dissociation à l'équilibre caractérisant l'interaction entre la thrombine et APT2 en solution,  $K_D^{sol} = 3,16 \pm 1,16$  nM. Cette méthode, basée sur l'évaluation de la concentration de thrombine libre (non complexée) dans un mélange comprenant à la fois la thrombine et des molécules APT2, est indépendante des interactions se déroulant à la surface de la biopuce. Ces interactions à la surface sont, *a contrario*, caractérisées par une constante de dissociation apparente,  $K_D^{surf}$ , différente de  $K_D^{sol}$ , et dépendante de la densité de greffage. Ces résultats viennent de faire l'objet d'une publication dans la revue PLoS One (Daniel 2013b).

Il est sans doute aisément possible d'étendre cette méthode rapide et sans marquage de détermination de  $K_D^{sol}$  à l'étude d'affinité entre différents aptamères et différentes cibles. La seule contrainte évidente est l'existence d'un unique site d'interaction entre la cible et son aptamère. Dans le cas contraire, la détection de la cible libre sur la biopuce ne serait plus possible lors des injections de mélange entre cible et compétiteur. La cible, même complexée avec l'aptamère en solution, aurait encore la possibilité d'interagir avec un aptamère fixé sur la surface *via* un autre site d'interaction. En réalité, la notion de  $K_D$  pour caractériser une interaction multi-sites entre une cible et un ligand n'est pas rigoureuse : plusieurs constantes doivent dans ce cas être définies, autant en fait, qu'il existe de sites de liaison. C'est pour cette raison que l'étude menée ici s'est concentrée sur l'interaction de la thrombine avec APT2, et non APT1. Comme nous allons effectivement le voir dans le chapitre suivant, les biopuces ont par la suite servi d'outil d'étude de structures plus complexes et ont notamment permis de confirmer la multi-sélectivité d'APT1 pour les deux exosites de la thrombine.

# 3

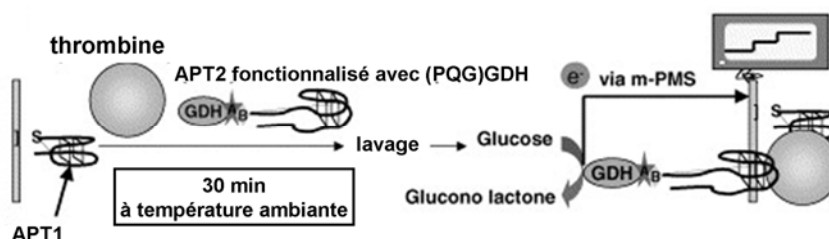
## FORMATION DU COMPLEXE « SANDWICH » DE LA THROMBINE AVEC SES DEUX APTAMERES

### 3.1 Introduction

L'un des points intéressants du choix de la thrombine comme protéine modèle dans cette étude est le fait que les deux aptamères APT1 et APT2 sont dirigés, *a priori*, contre deux sites différents de la protéine relativement éloignés l'un de l'autre (exosite I et exosite II). Ce point n'a pas du tout été exploité dans le précédent chapitre mais constitue l'aspect central de celui-ci, dont les résultats ont fait l'objet d'une publication dans la revue Biosensors & Bioelectronics (Daniel 2013a).

Du fait de l'éloignement des deux exosites, il est raisonnable de penser que la formation d'un complexe plus évolué, comprenant la thrombine et les deux aptamères, est possible : il s'agit de la conformation dite « sandwich », où la thrombine interagit avec APT1 et APT2 à la fois. Bien que certains doutes aient parfois été évoqués sur l'identification du site de la thrombine impliqué dans son interaction avec APT1 (Padmanabhan 1993; Pagano 2008), un certain nombre de preuves de l'implication de l'exosite I, et d'autres preuves de l'implication de l'exosite II pour son interaction avec APT2, furent jugées suffisantes par de nombreuses équipes pour mettre au point des biocapteurs de thrombine impliquant à la fois APT1 et APT2. La première publication reportant le développement d'un tel principe de détection date de 2005 et concerne un biocapteur électrochimique où l'un des aptamères (APT1) est utilisé comme sonde à la surface d'une électrode d'or, et le deuxième aptamère (APT2) est marqué avec une enzyme oxydo-réductase (Ikebukuro 2005). Le signal de détection est provoqué par l'ajout du substrat de l'enzyme et la mesure du courant généré par l'oxydoréduction de ce dernier

permet de quantifier la concentration de thrombine (**Figure 3.1**). La limite de détection de ce système était déjà de 10 nM. Depuis, de plus en plus de biocapteurs ont employé ce même principe de construction « sandwich » pour détecter la thrombine plus spécifiquement et de façon plus sensible, sans marquage direct de la protéine : jusqu'à 100 pM par QCM (microbalance à quartz) (Chen 2010) et SPR (Bai 2013), 64 pM par fluorescence (Edwards 2010) ou encore 30 fM par électrochimie (Zhao 2011) pour n'en citer que quelques-uns (on compte aujourd'hui plusieurs dizaines de ces systèmes « sandwich »).



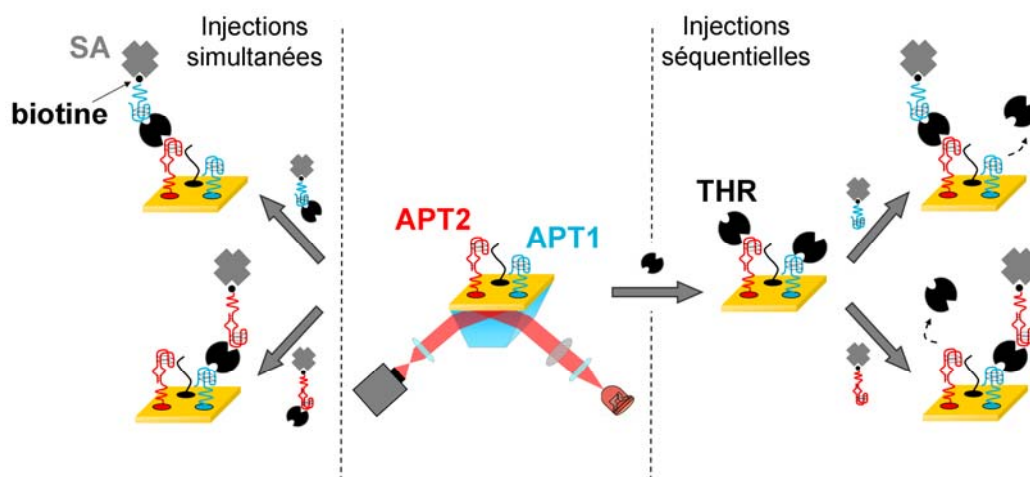
**Figure 3.1** Schéma système de détection électrochimique de la thrombine utilisant pour la première fois les deux aptamères pour former la structure sandwich, d'après (Ikebukuro 2005). APT1 modifié par un groupement thiol est immobilisé sur une électrode d'or. La protéine cible (thrombine) et APT2 fonctionnalisé avec l'enzyme (PQG)GDH sont ajoutés en solution, et la réponse en courant générée par l'addition de glucose est mesurée.

Cependant, tous ces capteurs « sandwich » nécessitent un marquage du second aptamère afin de générer, ou tout du moins d'amplifier (le plus souvent grâce à des nano-objets), le signal de détection de la thrombine. De façon surprenante, la seule étude relatant l'utilisation du deuxième aptamère nu pour une détection en temps réel sans marquage par SPR (Tang 2007) montrait que ce dernier ne permettait pas d'amplifier le signal obtenu lors de l'ajout précédent de thrombine. De plus, la majorité des techniques de détection utilisées dans ces biocapteurs sont des techniques de détection en « point final » qui ne permettent absolument pas de révéler les données cinétiques de la formation du sandwich.

D'un autre côté, il est connu que certains des ligands naturels de la thrombine peuvent provoquer, par leur fixation sur l'un ou l'autre des exosites, de multiples effets allostériques modifiant l'activité enzymatique de la thrombine (Myrmel 1976; Walker 1979; Liu 1991; Bock PE 1992; Jackman 1992; Liu 1994; Vijayalakshmi 1994; Fredenburgh 1997; Colwell 1998; Liaw 1998; Verhamme 2002; Rezaie 2003; Yang 2003; Lane 2005), ce qui constitue un des aspects importants de leur rôle de régulateurs de la cascade de la coagulation. Par contre, l'effet potentiel allostérique inter-exosite causé par les deux aptamères n'a été, lui, qu'assez peu étudié (Zhou 2010; Olmsted 2011).

Notre biopuce largement décrite au chapitre précédent fut l'outil idéal pour l'investigation des paramètres cinétiques de la formation du sandwich sur la puce et la mise en évidence d'un éventuel effet allostérique inter-exosite. La présence des deux aptamères sur la puce a ainsi permis de tester les différentes configurations possibles (l'élément sonde et l'aptamère secondaire pouvant être indifféremment APT1 et APT2). La biotinylation de l'aptamère secondaire a de plus conduit à l'ajout d'une étape d'amplification supplémentaire *via* la formation du complexe biotine-streptavidine d'une exceptionnelle affinité ( $K_D$  de l'ordre du fM). Finalement, différentes stratégies furent employées afin de comparer l'efficacité d'une

amplification potentielle : dans un premier temps l'injection séquentielle de chaque élément a été réalisée afin de vérifier l'influence de chaque élément séparément, puis nous avons testé des injections simultanées de certains de ces éléments (**Figure 3.2**).



**Figure 3.2** Schéma de principe de l'étude de la formation du sandwich sur la biopuce. Différentes stratégies sont explorées : les injections séquentielles des différents éléments constituant le complexe (la thrombine (THR) - l'aptamère secondaire biotinylé (APT1-bio ou APT2-bio) – l'élément amplificateur (streptavidine SA)) ou des injections simultanées de ces éléments.

En analysant l'ensemble des résultats obtenus nous avons pu tirer quelques conclusions concernant la réelle sélectivité des aptamères pour les exosites I et II de la thrombine, le choix d'un protocole optimisé de détection et enfin l'existence d'un effet allostérique inter-exosite. Ces conclusions sont détaillées dans les différentes parties de ce chapitre, après une première partie de description des résultats obtenus lors de toutes les stratégies testées.

## 3.2 Formation du sandwich et amplification du signal

### 3.2.1 Choix des sondes et protocoles de détection

#### *Elaboration des biopuces*

Les biopuces réalisées pour la détection du sandwich sont sensiblement les mêmes que celles décrites au chapitre 2 et le procédé d'élaboration est identique.

Le plan de dépôt a été choisi pour faire figurer tous les contrôles nécessaires :

- Les plots aptamères APT1 et APT2 sont présents en trois réplicats chacun et déclinés en deux densités de greffage correspondant aux deux concentrations 10 et 20  $\mu\text{M}$  de sondes thiolées dans la solution de dépôt. Sauf si précisé, les résultats exposés dans la suite du chapitre correspondent à la moyenne des trois plots de forte densité, qui donnent systématiquement des signaux plus élevés que les plots faible densité.
- Les plots contrôles sont composés de deux réplicats des séquences complémentaires aux séquences aptamères, notés APT1c et APT2c (concentration de 10  $\mu\text{M}$  dans la

solution de dépôt). Le choix de ces séquences permet à la fois un contrôle négatif lors des injections de thrombine et un contrôle positif d'hybridation lors de l'injection de l'aptamère secondaire APT1 ou APT2 biotinylé. La séquence Zip9 (concentration de 10 et 20  $\mu\text{M}$  dans la solution de dépôt) est également toujours utilisée comme contrôle purement négatif (trois réplicats déclinés dans les deux densités de greffage) mais n'est souvent pas représentée dans les résultats pour ne pas surcharger les graphiques lorsqu'elle n'apporte aucune information supplémentaire par rapport aux autres plots contrôles.

Les biopuces sont toujours soumises à une étape de blocage avant une première utilisation (1h30 dans la solution de blocage) et sont caractérisées par l'injection successive des séquences complémentaires des séquences greffées sur la puce afin de vérifier la réponse appropriée de chaque plot.

### *Protocoles de détection*

Le protocole de détection dépend de la stratégie de formation du sandwich employée (injections séquentielles ou simultanées) mais reproduit toujours les paramètres suivant :

- Le tampon est délivré à un débit de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ . Les injections réalisées sont, soit des injections « courtes » à débit 50 $\mu\text{L}/\text{min}$  constant, d'une durée maximale de 10 minutes, soit des injections « longues » à débit 50 $\mu\text{L}/\text{min}$  avec le mode « va et vient » activé : 10  $\mu\text{L}$  de volume poussé, 5  $\mu\text{L}$  de volume aspiré (débit équivalent 16,7  $\mu\text{L}/\text{min}$ ), coupées au bout de 30 minutes.
- La régénération de la puce est toujours réalisée avant une injection de thrombine par une injection courte de sel NaCl 1M de 8 minutes. Afin de déshybrider les brins appariés sur les plots contrôles, une injection d'hydroxyde de sodium NaOH 50mM de 2-3 minutes est parfois également réalisée.
- La thrombine est toujours injectée à une concentration de 50 nM et l'aptamère secondaire biotinylé à une concentration deux fois plus importante (soit 100 nM). Lorsque la streptavidine est co-injectée avec l'aptamère biotinylé elle est ajoutée en large excès (500 nM) afin d'assurer la complète complexation de tous les aptamères biotinylés et de favoriser le ratio 1 :1 (sachant que la streptavidine possède 4 sites d'interaction avec la biotine). Par contre lorsqu'elle est injectée seule, une concentration 10 fois plus faible (50 nM) est jugée suffisante pour amplifier les complexes formés préalablement sur la puce, au vu de l'intensité de l'interaction biotine-streptavidine.

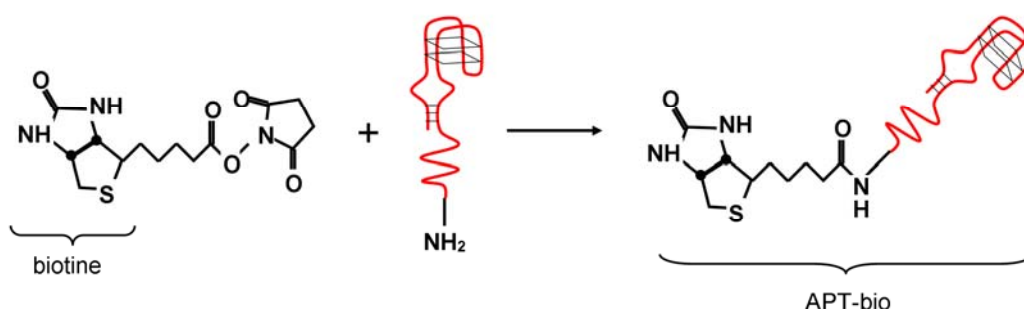
Pour plus de détails, l'ensemble des protocoles employés pour chaque série d'injections est numéroté sur les figures, de P1 à P9, et détaillé dans l'Annexe D.

### Biotinylation de l'aptamère secondaire

La stratégie d'amplification du signal de formation du sandwich repose sur la fonctionnalisation de l'aptamère secondaire injecté en solution par une molécule de biotine (masse moléculaire ~200 Da), très utilisée en biochimie du fait de son affinité exceptionnellement élevée pour la protéine streptavidine (masse moléculaire ~60 kDa). Cette affinité est caractérisée par une constante d'association de l'ordre du femtomolaire, ce qui en fait une des interactions non covalentes les plus fortes trouvées dans la Nature.

La fixation de streptavidine sur la puce permet d'amplifier les signaux SPR du fait de la masse importante de la protéine, comparée par exemple à celle de l'aptamère seul (masse moléculaire APT1 ~8 kDa et APT2 ~12.3 kDa).

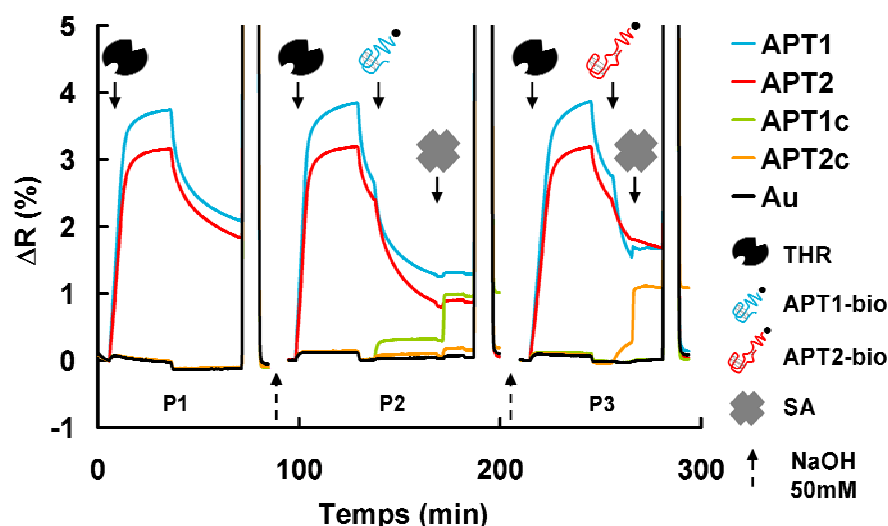
Afin de permettre la fixation de cette molécule, les aptamères secondaires injectés en solution ont donc été biotinylés (i.e. fonctionnalisés avec une molécule de biotine). Pour cela, un protocole identique à celui de la fonctionnalisation des aptamères par un groupement thiol a été suivi. Le groupement amine présent à l'extrémité 5' des séquences oligonucléotides a été couplé par l'intermédiaire d'un ester activé NHS à une molécule de biotine-NHS (**Figure 3.3**).



**Figure 3.3** Fonctionnalisation des séquences aptamères en 5' avec une biotine. La réaction de couplage s'effectue entre l'oligonucléotide modifié par un groupe amine primaire en 5' et une molécule de couplage activée par un ester NHS.

### 3.2.2 Formation séquentielle du sandwich

La **Figure 3.4** présente le résultat obtenu lors de l'injection séquentielle des éléments constitutifs du complexe. La première injection réalisée (P1) correspond à une injection de thrombine seule 50 nM servant d'étalon pour le reste des configurations testées. On retrouve le profil habituel des signaux générés sur les plots APT1 et APT2 : la phase d'association est suivie directement de la phase de dissociation lorsque l'injection prend fin et que le tampon seul repasse sur la puce. On remarque que le niveau de signal non spécifique sur les plots contrôles ainsi que sur l'or nu (Au) reste très faible ( $\Delta R < 0.1\%$ ).

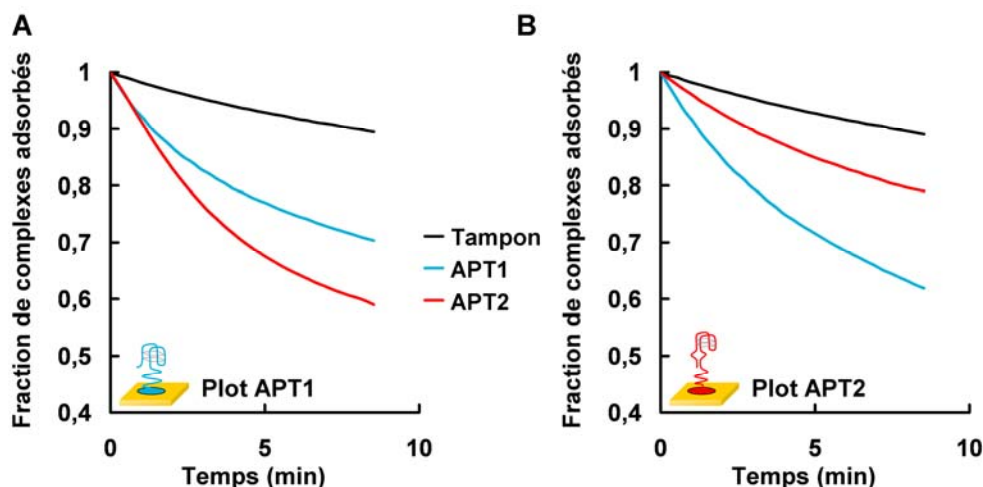


**Figure 3.4** Variations de réflectivité (en %) enregistrées par SPRi après des injections séquentielles de thrombine (THR), aptamère secondaire biotinylé (APT1-bio ou APT2-bio) et streptavidine (SA). Avant chaque injection de thrombine la régénération de la puce est assurée avec une injection NaCl 1 M. Les flèches en pointillées indiquent qu'une injection NaOH 50 mM a également été réalisée afin de dissocier les brins complémentaires d'ADN hybridés sur les plots contrôles (APT1c et APT2c).

La deuxième et la troisième série d'injections (P2 et P3) commencent de façon identique par une injection de thrombine mais celle-ci est suivie, peu de temps après le début de la phase de dissociation, par l'injection de l'aptamère secondaire biotinylé (APT1-bio dans la deuxième série et APT2-bio dans la troisième). Cette seconde injection est réalisée suffisamment tôt afin de s'assurer qu'il reste un nombre suffisant de molécules de thrombine adsorbées sur la surface. Cependant l'effet de cette seconde injection est surprenant : tous les signaux (à l'exception de celui du plot contrôle complémentaire de l'aptamère injecté) diminuent brusquement. Sur les plots où sont greffés les aptamères identiques à ceux injectés (ex : plot APT1 lors de l'injection APT1-bio), l'équilibre est déplacé en solution dû à l'effet de compétition se déroulant entre les aptamères greffés et ceux injectés en solution : une accélération de la dissociation était effectivement prévisible. Mais sur les plots où sont greffés les aptamères différents de ceux injectés en solution (ex : plot APT2 lors de l'injection APT1-bio) le même phénomène se produit, contrairement à ce que la formation d'une structure sandwich devrait provoquer : au lieu de voir une augmentation du signal traduisant l'accrochage de l'aptamère secondaire biotinylé sur le complexe déjà formé par la thrombine et l'aptamère sonde, une nette dissociation se produit également. Cet effet est observé à la fois lors de l'injection d'APT1-bio sur les plots APT2 (P2) et lors de l'injection d'APT2-bio sur les plots APT1 (P3).

Pour une meilleure comparaison des vitesses de dissociation observées, les courbes de dissociation sont re-normalisées sur la **Figure 3.5** pour exprimer le taux de complexes formés par l'aptamère greffé et la thrombine restant sur la puce après l'injection de thrombine. Pour cela, les valeurs de réflectivité sont rééchelonnées à 1 au moment de l'injection de l'aptamère secondaire, soit environ 8 minutes après la fin de l'injection de thrombine. La vitesse de dissociation la plus faible est observée pour le passage simple de tampon sans

injection d'aptamère secondaire (courbe noire) alors qu'elle est la plus forte lors de l'injection d'APT2 sur les plots APT1 (courbe rouge en A) et lors de l'injection d'APT1 sur les plots d'APT2 (courbe bleue en B) !



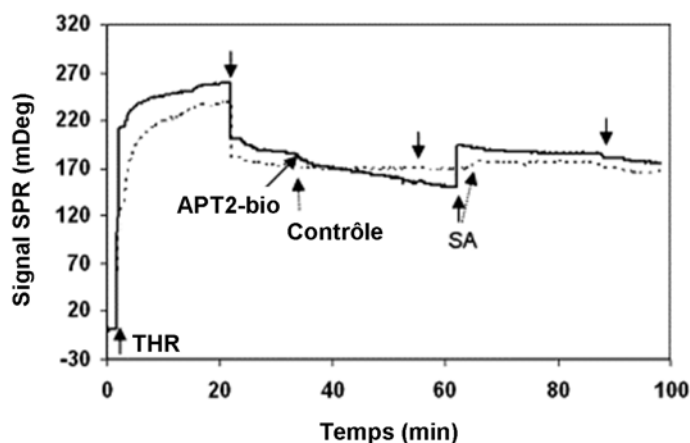
**Figure 3.5** Cinétiques de dissociation de la thrombine sur les plots APT1 (A) et APT2 (B). Les courbes ont été re-normalisées 8 minutes après la fin d'injection de la thrombine, au moment de l'injection de l'aptamère secondaire (APT1-bio en bleu, ou APT2-bio en rouge).

La superposition de ces signaux permet ainsi de se rendre compte que, non seulement l'injection de l'aptamère secondaire semble déstabiliser le complexe formé par la thrombine et l'aptamère primaire greffé sur la puce, mais que l'effet est encore plus fort que celui de compétition observé lorsque l'aptamère injecté est le même que celui greffé à la surface.

De plus la dernière injection de streptavidine, qu'elle suive très rapidement l'injection courte de l'aptamère secondaire (P3) ou qu'elle soit plus espacée dans le temps après une injection longue de l'aptamère secondaire (P2), ne provoque qu'une très faible amplification du signal sur les plots aptamères où le complexe sandwich aurait théoriquement pu se former. Pourtant l'interaction entre la streptavidine et l'aptamère biotinylé est bien validée par l'amplification observée du signal d'hybridation sur les plots contrôles, ce qui accentue le doute sur la réelle présence de complexes sandwich sur la puce. De tels résultats ont déjà été observés, dans une moindre mesure, par Tang *et al.* (Tang 2007) sans que des explications supplémentaires ne soient fournies (**Figure 3.6**).

Il faut également noter que nos expériences ont d'abord été réalisées avec des aptamères secondaires non-biotinylés qui ont donné les mêmes résultats que ceux observés ici avant l'injection de streptavidine. La fonctionnalisation des aptamères avec une biotine n'est donc pas responsable du phénomène.

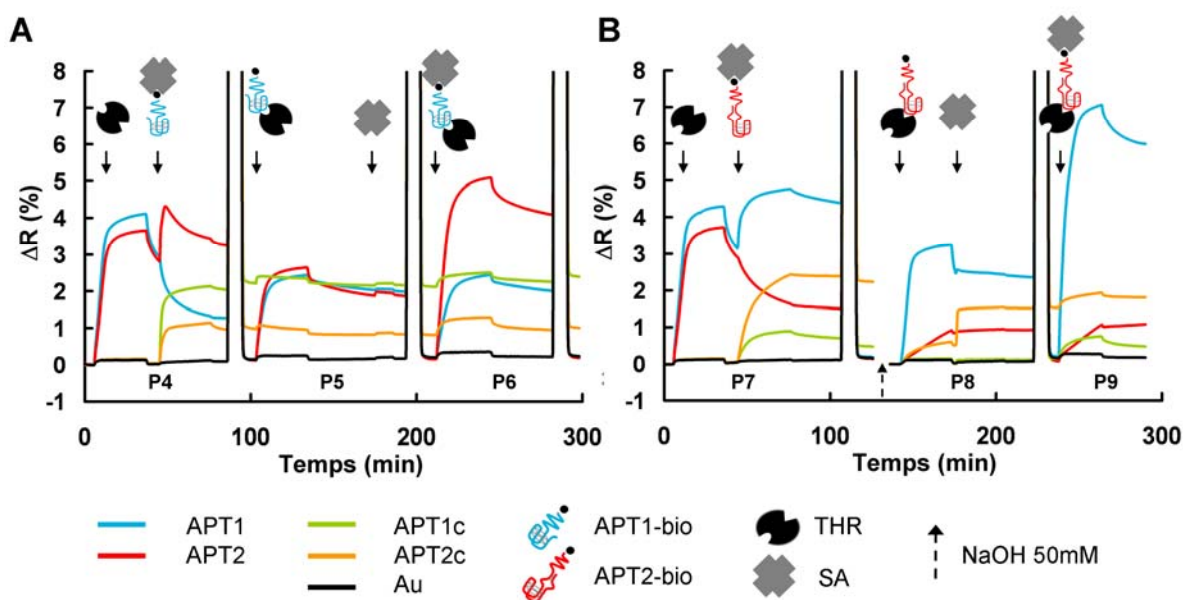




**Figure 3.6** Etude de la formation du complexe sandwich APT1-THR-APT2-bio par Tang *et al.* issue de (Tang 2007). APT1 a d'abord été immobilisé dans deux canaux sur lesquels la thrombine (THR) est injectée à une concentration de 500 nM. A la fin de l'association, 1  $\mu$ M de l'aptamère secondaire biotinylé APT2-bio (courbe pleine) ou d'une séquence contrôle aléatoire biotinylée (courbe en pointillé) est injecté. Finalement la streptavidine (SA) 0,1 mg/mL est également injecté. Les flèches dirigées vers le bas indiquent la fin des injections et le retour en tampon.

### 3.2.3 Formation du sandwich par co-injections

Considérant que la formation du sandwich n'était pas observable *via* une injection séquentielle des différents éléments le composant, d'autres stratégies ont été testées. Elles sont basées sur la réduction du nombre d'étapes par co-injection (ou injection simultanée) de certains des éléments du sandwich sur la puce (protocoles P4 à P9). Les résultats sont visibles sur la **Figure 3.7**, séparés en A, pour toutes les séries d'injections concernant l'emploi d'APT1-bio comme aptamère secondaire biotinylé, et en B, pour l'emploi d'APT2-bio.



**Figure 3.7** Variations de réflectivité (en %) enregistrées par SPRi après des injections simultanées de thrombine (THR) / aptamère APT1 (A) ou APT2 (B) / streptavidine (SA). Avant chaque injection de thrombine la régénération de la puce est assurée avec une injection NaCl 1 M. Les flèches en pointillées indiquent qu'une injection NaOH 50 mM a également été réalisée.

La première stratégie testée (P4 et P7) consiste à injecter à nouveau la thrombine seule dans un premier temps, puis à injecter simultanément l'aptamère secondaire biotinylé pré-complexé avec la streptavidine. Du fait du poids moléculaire relativement élevé de ce complexe aptamère-streptavidine (~ 70 kDa), le signal SPR relatif à la dissociation de la thrombine est cette fois en partie contrebalancé par l'augmentation du signal due à la fixation du complexe aptamère-streptavidine sur la thrombine toujours adsorbée sur la puce. L'observation de cette augmentation de signal permet de confirmer finalement la formation possible du sandwich entre la thrombine, les aptamères et la streptavidine lorsque l'aptamère injecté est différent de celui déjà greffé sur la puce (APT1-bio-SA sur les plots APT2 et APT2-bio-SA sur les plots APT1). L'accélération de la décroissance du signal liée à la compétition entre l'aptamère secondaire injecté et l'aptamère greffé à la surface lorsqu'ils sont identiques (APT1-bio-SA sur les plots APT1 et APT2-bio-SA sur les plots APT2) est par contre maintenue.

La stratégie suivante (P5 et P8) consiste cette fois à injecter la thrombine pré-complexée avec l'aptamère secondaire, puis la streptavidine seule dans le but d'amplifier le signal. L'adoption de cette stratégie donne des résultats différents selon l'aptamère secondaire biotinylé considéré (APT1-bio ou APT2-bio). Lorsque celui-ci est APT2-bio (protocole P8), les plots APT1 donnent une réponse sensiblement comparable à celle obtenue avec le protocole P1 lorsque la thrombine est injectée seule, avec seulement une légère diminution du niveau d'équilibre (alors qu'on pourrait s'attendre à un effet inverse vu que le poids du complexe adsorbé est plus élevé que celui de la thrombine seule). En parallèle, les plots APT2 donnent, eux, une réponse complètement différente : le signal d'association est énormément réduit et ralentit comparé à celui obtenu lors de l'injection de la thrombine seule. Cela est consistant avec l'idée qu'une large partie de la thrombine présente en solution est déjà complexée avec APT2-bio et qu'il n'en reste seulement qu'une petite fraction sur laquelle l'exosite II n'est pas occupé et est libre d'interagir avec l'aptamère APT2 greffé à la surface. D'un autre côté, lorsque l'aptamère secondaire pré-complexé avec la thrombine est APT1-bio (protocole P5), les réponses des plots APT2 et APT1 sont similaires et quasiment aussi rapides que celles obtenues lors de l'injection de thrombine seule. Le niveau d'équilibre est par contre à nouveau légèrement plus bas, ce qui montre encore une fois que l'ajout de l'aptamère secondaire seul ne permet nullement d'amplifier le signal de reconnaissance de la thrombine. On note en particulier que la formation en solution du pré-complexe thrombine-APT1-bio ne semble pas perturber significativement la reconnaissance de la thrombine par les plots APT1, contrairement à ce qui a pu être observé avec APT2-bio sur les plots APT2. Finalement l'ajout de streptavidine après la fin de la première injection ne provoque aucune amplification consistante de signal sur les plots aptamères. Seuls les plots contrôles APT2c non saturés en streptavidine durant le protocole P8 donnent un signal positif correspondant à l'amplification du signal d'hybridation précédent d'APT2-bio sur ces plots.

La dernière stratégie employée (P6 et P9) consiste à injecter tous les éléments en une seule étape. Le pré-assemblage des trois éléments (thrombine-aptamère secondaire biotinylé-

streptavidine) provoque le plus fort signal SPR enregistré sur les plots où l'aptamère greffé est différent de l'aptamère secondaire injecté. Comparée à la stratégie précédente (P5 et P8), cette stratégie permet ainsi d'augmenter fortement le signal obtenu sur les plots aptamères différents de celui injecté mais ne modifie pas du tout le signal obtenu sur les plots aptamères identiques à celui injecté.

Finalement la meilleure amplification réalisée, toute stratégie confondue, et tout plot considéré, est celle effectuée *via* l'injection globale simultanée de tous les éléments pré-complexés formant l'ensemble thrombine-APT2-bio-streptavidine sur les plots APT1 (+ 7% de réflectivité mesurée).

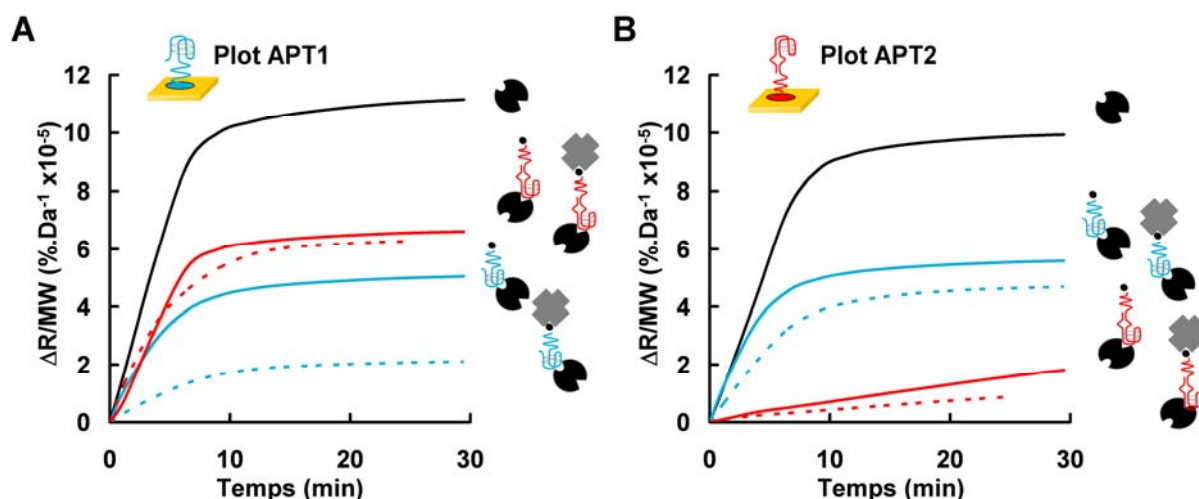
### 3.2.4 Quantification du nombre de complexes formés sur la puce

Les données cinétiques en temps réel obtenues par SPRi peuvent être interprétées en termes de nombres de complexes formés sur la puce. Pour cela, nous avons exploité le lien de proportionnalité existant entre la variation de réflectivité observée et la masse déposée sur la surface si l'on considère que l'indice de réfraction est le même pour toutes les molécules biologiques utilisées, *i.e.* la thrombine, les aptamères et la streptavidine. Les masses moléculaires considérées sont celles de la thrombine (36,7 kDa), d'APT1 (8 kDa), d'APT2 (12,3 kDa) et de la streptavidine (60 kDa). Au vu des masses respectives de ces molécules il est évident que la liaison de l'aptamère secondaire sur la thrombine n'a pas la capacité d'amplifier significativement le signal provoqué par la fixation de la thrombine seule, avec sa masse 3 fois plus faible que celle de la thrombine. Par contre, associé à la streptavidine, il obtient théoriquement la masse nécessaire pour multiplier quasiment par 3 le signal détecté lors de la fixation de la thrombine seule, en se pré-complexant à cette dernière avant l'injection.

Le remplacement de la streptavidine par un autre facteur d'amplification de masse plus importante pourrait permettre une amélioration de cette amplification. Il est d'autre part bien connu qu'une nanobille d'or recouverte de streptavidine accroît cette amplification grâce aux propriétés plasmoniques des nanobilles d'or (Kwon 2012). Cependant l'effet amplificateur n'est dans ce cas plus seulement lié à la masse du complexe injecté et une analyse en termes de nombres de complexes adsorbés sur la puce n'est plus possible. Pour cette étude, cette option n'a donc pas été réalisée.

Dans notre cas, en divisant simplement le signal obtenu pendant les phases d'association par le poids moléculaire du complexe injecté (la thrombine seule, la thrombine pré-complexée avec l'aptamère secondaire 1 ou 2, et la thrombine pré-complexée avec l'aptamère secondaire 1 ou 2 lié à la streptavidine) nous obtenons sur la **Figure 3.8** un signal proportionnel au nombre de complexes adsorbés sur la surface. Pour cela il faut néanmoins considérer que l'ensemble des molécules de thrombine sont bien pré-complexées en solution. Cette hypothèse est raisonnable au vu des valeurs de  $K_D$  connues caractérisant les interactions entre la thrombine et les aptamères APT1 et APT2 (de l'ordre du nanomolaire) et les concentrations injectées de thrombine (50 nM) et d'aptamères (100 nM). Nous estimons ainsi que plus de

90% de la thrombine est effectivement pré-complexée avec l'aptamère biotinylé en solution. Lorsque la streptavidine est également co-injectée, le très faible  $K_D$  caractérisant l'interaction biotine-streptavidine (de l'ordre du femtomolaire) garantit la complète fixation de l'aptamère biotinylé sur des molécules de streptavidine.



**Figure 3.8** Variations de réflectivités (en %) enregistrées par SPRi sur les plots APT1 (A) et APT2 (B) normalisées par le poids moléculaire du complexe injecté de façon à comparer le nombre de complexes adsorbés sur la puce. Différentes injections sont considérées : celle de la thrombine seule, celle de la thrombine pré-complexée avec l'aptamère secondaire (APT1-bio en bleu et APT2-bio en rouge) et celle de la thrombine pré-complexée avec l'aptamère secondaire ET la streptavidine (en pointillés).

La **Figure 3.8A** présente les résultats obtenus sur les plots APT1. Une évidente réduction du nombre de complexes adsorbés est observée lorsque la thrombine est injectée pré-complexée avec un aptamère secondaire biotinylé couplé ou non à la streptavidine. Lorsque la thrombine est pré-complexée avec APT2-bio seul et APT2-bio-SA, un nombre similaire de complexes se lie à APT1, soit environ 50-60% du nombre de molécules de thrombine lorsqu'elle est injectée seule. Les résultats similaires obtenus avec et sans streptavidine confirment qu'il s'agit bien du pré-complexe entier qui se lie à la surface et que tous les aptamères biotinylés sont effectivement liés à une molécule de streptavidine. De façon plus surprenante les signaux normalisés correspondant aux injections de thrombine pré-complexée avec APT1-bio seul et APT1-bio-SA diffèrent d'au moins un facteur 2. Cela semble suggérer la présence de thrombine sur les plots APT1 mais pas celle des complexes complets APT1-thrombine-APT1-bio et APT1-thrombine-APT1-bio-SA. En fait le ratio observé entre les deux co-injections n'est compatible qu'avec la présence de thrombine seule sur les plots APT1.

Les résultats correspondant aux plots APT2 présentés sur la **Figure 3.8B** sont compatibles avec la fixation du complexe entier thrombine-APT1-bio et thrombine-APT1-bio-SA (avec toujours une moindre efficacité que celle de la thrombine seule !) et avec l'absence de complexe formé avec APT2-bio. La réponse faible et linéaire observée lors de l'injection de la thrombine pré-complexée avec APT2-bio seul ou APT2-bio-SA est similaire

à l'injection de thrombine seule en solution à une concentration réduite de 5 nM ou moins (*cf* chapitre 2, **Figure 2.13**). Ceci confirme l'estimation qui avait été faite : plus de 90% de la thrombine est effectivement pré-complexée en solution et donc non disponible pour interagir avec les plots APT2.

### **3.3 Sélectivité des aptamères pour les exosites de la thrombine**

L'existence des deux exosites de la thrombine, potentiels sites d'interaction avec les aptamères, pose la question de la réelle sélectivité des aptamères APT1 et APT2 pour l'un de ces exosites.

L'interaction entre APT2 et l'exosite II n'a jamais été remise en cause après les premières études de compétitions menées par Tasset *et al.*, retranscrites dans la publication décrivant la sélection de l'aptamère APT2 (Tasset 1997). De fait, cette interaction a été beaucoup moins étudiée que celle d'APT1 avec la thrombine. Pour cette dernière nous avons déjà vu que certains arguments jouaient en faveur d'une double interaction : l'une avec l'exosite I et l'autre avec l'exosite II. La question n'est assurément pas claire et par conséquent pas toujours adressée dans les différentes études menées sur la thrombine et APT1. Ainsi certaines études vont jusqu'à n'utiliser qu'APT1 seul pour une détection de type sandwich en utilisant à la fois l'aptamère comme sonde primaire et comme révélateur secondaire (Li B 2008; Wang 2009; Ding 2010; Bai 2011) alors que d'autres publications n'en tiennent absolument pas compte pour calculer des valeurs de  $K_D$  (Olmsted 2011) ou utiliser APT1 comme compétiteur spécifique de l'exosite I (Gronewold 2005; Zhou 2010). Pourtant la réactivité croisée d'APT1 avec les deux exosites peut significativement interférer dans la formation du sandwich : les conséquences sur les protocoles d'amplification peuvent être importantes et seront discutées dans la partie suivante. De plus cette réactivité croisée pose la question d'une définition claire d'un  $K_D$  pour qualifier cette interaction : deux constantes, chacune correspondant à l'interaction avec un exosite précis, devraient dans ce cas être proposées. La détermination d'une seule constante apparente alors même que deux interactions ont lieu simultanément peut contribuer à la grande variabilité des valeurs de  $K_D$  apparents rencontrées dans la littérature pour caractériser cette interaction : depuis quelques nM (Ahmad 2011; Olmsted 2011; Zhou 2011) jusqu'à la centaine ou plus (Macaya 1995; Tasset 1997; Muller 2007; Lin 2011).

Dans notre étude, les résultats obtenus sur les plots APT2 lors des injections et co-injections d'APT2-bio comme aptamère secondaire semblent indiquer clairement que l'aptamère n'interagit effectivement qu'avec un seul exosite. C'est la raison pour laquelle l'étude plus quantitative sur les  $K_D$  à la surface du biocapteur et en solution du chapitre 2 fut menée avec cet aptamère.

Au contraire, les résultats obtenus lors de l'emploi d'APT1-bio comme aptamère secondaire sur les plots APT1 ne permettent pas de tirer une conclusion aussi claire. Le signal élevé et rapide généré sur ces plots semble indiquer que l'aptamère peut interagir dans une certaine

mesure avec deux sites différents. Cependant aucun effet d'amplification n'a été détecté par l'addition de la streptavidine dans le mélange, ce qui n'a pas permis de valider la présence de sandwich APT1-thrombine-APT1-bio-SA sur la surface. Plusieurs études y étant parvenues (même si leurs résultats ne fournissent aucune information cinétique), nous pouvons raisonnablement supposer que cette formation est bien possible. Cependant il est probable qu'elle ne soit pas très stable et que l'une des interactions (celle avec l'exosite I si l'on en croit la littérature) soit favorisée au détriment de l'autre.

Si l'on s'intéresse à l'explication de cette différence de sélectivité entre les deux exosites, il est possible d'émettre une hypothèse à partir de la structure secondaire de ces deux aptamères. Bien qu'étant très proches dans leur séquence et leur conformation (cf **Figure 1.14**, p.34), APT2 présente une séquence plus longue caractérisée par la formation d'un petit duplex à partir des deux extrémités de la séquence encadrant le G-quadruplex. Il a été montré récemment que ce duplex jouerait un rôle central dans son interaction avec la thrombine (Lin 2011). Cette légère différence structurale pourrait expliquer la plus grande sélectivité de cet aptamère comparé à APT1.

### **3.4 Choix d'un bon protocole d'amplification**

L'ensemble de cette étude SPR a permis de mieux apprécier la dynamique engendrée par la formation ou l'absence de formation du sandwich lors de l'ajout d'un second aptamère sur un complexe pré-formé de la thrombine avec un premier aptamère. L'ensemble des possibilités testées nous fournit ainsi les clés pour établir un protocole le plus performant possible quant à l'amplification d'un signal de détection de la thrombine par l'utilisation de la structure sandwich.

Les premières expériences (protocoles P2 et P3 de la **Figure 3.4**) ont montré que les injections séquentielles de la thrombine, de l'aptamère secondaire et de la streptavidine n'aboutissaient qu'à une formation peu efficace de structures sandwich, non détectable par SPRi. De telles structures furent néanmoins détectées en co-injectant l'aptamère secondaire directement avec l'élément amplificateur (streptavidine) (protocoles P4 et P7 de la **Figure 3.7**) et que l'amplification était encore plus efficace lors de la co-injection de tous les éléments formant le complexe (protocoles P6 et P9 de la **Figure 3.7**). Cette stratégie d'injections simultanées a déjà prouvé son efficacité face à la stratégie d'injections séquentielles avec d'autres techniques de détection de la thrombine (Sosic 2011), ce qui montre que ce résultat n'est bien sûr pas limité à une technique de détection SPRi.

Le sandwich est principalement formé sur les plots où l'aptamère greffé est différent de l'aptamère secondaire injecté en solution, conduisant bien à la formation d'un sandwich APT1-thrombine-APT2. Cependant il est important de noter que seule la moitié des sandwichs complets est formée si l'on compare le nombre de complexes adsorbés sur la puce lorsque la thrombine est co-injectée et lorsqu'elle est injectée seule (**Figure 3.8**). Cette réduction du nombre de complexes formés semble due au fait que la fixation d'un aptamère

sur une molécule de thrombine déjà liée à un autre aptamère est moins efficace que celle sur une molécule de thrombine seule (effet allostérique négatif discuté dans la prochaine partie). De ce fait, en absence d'élément amplificateur (protocoles P5 et P8 de la figure **Figure 3.7**), le signal formé par le sandwich est plus faible que celui formé par la fixation de la thrombine seule.

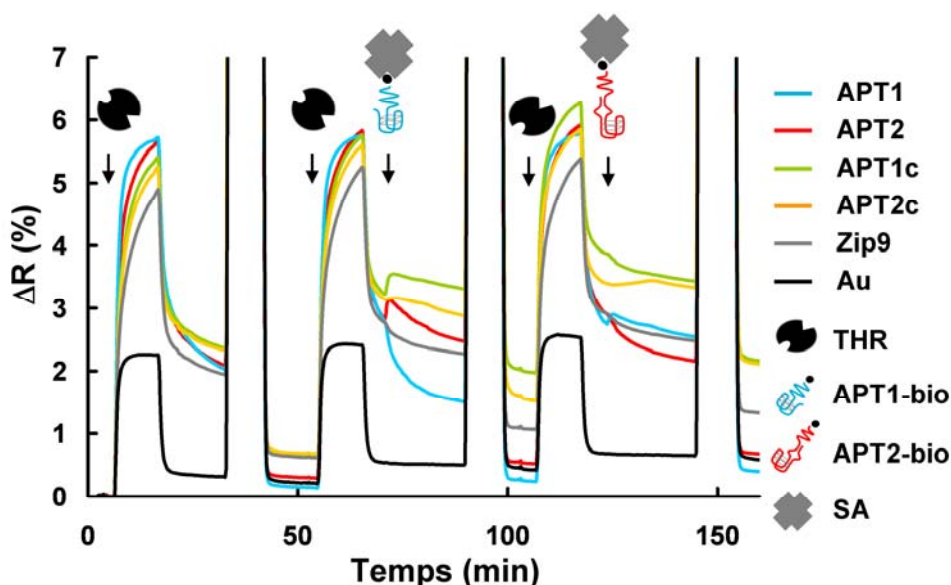
De plus aucun sandwich APT2-thrombine-APT2 n'a été détecté et des doutes subsistent sur la formation du sandwich APT1-thrombine-APT1 à la surface de la biopuce. Ceci est particulièrement évident lorsque l'on compare les protocoles P5 et P8 (injection de la thrombine pré-complexée avec l'aptamère secondaire biotinylé) avec les protocoles P6 et P9 (injection de la thrombine pré-complexée avec l'aptamère secondaire biotinylé lié à la streptavidine) : l'ajout de streptavidine au mélange ne permet pas d'augmenter le signal de détection sur les plots où l'aptamère greffé est identique à celui injecté, ce qui laisse supposer que seule la thrombine libre est détectée, et non le sandwich complet. Ces résultats laissent entendre que le remplacement d'un aptamère APT1 par l'aptamère APT2 en tant que molécule sonde ou marqueur dans des études basées sur l'amplification du sandwich APT1-thrombine-APT1 (Li B 2008; Ding 2010; Bai 2011) devrait permettre d'obtenir de meilleurs résultats. L'équipe de Y. Wang et B. Liu ont testé deux configurations différentes en gardant chaque fois APT1 comme aptamère marqueur (marqué avec un fluorophore) mais en considérant APT1 et APT2 comme aptamère sonde (greffé sur des nanoparticules de silice) (Wang 2009). Leurs résultats confirment nos conclusions : le signal de détection est meilleur lorsque le sandwich repose sur l'utilisation des deux aptamères différents APT1 et APT2.

Finalement, une fois le choix du sandwich APT1-thrombine-APT2 réalisé, il est intéressant de se demander quel est le meilleur choix à faire concernant l'utilisation de l'aptamère sonde greffé à la surface (et par conséquent celui qui sert de marqueur ou d'amplificateur). La plupart des études utilisent de fait APT1 comme molécule sonde (Ikebukuro 2005; Centi 2007; Tang 2007; Huang 2009; Zhao 2009; Chen 2010; Edwards 2010; Huang 2010; Tennico 2010; Wang Y 2011b; Zhao 2011). Ce choix est cohérent avec nos résultats : il correspond au maximum de signal enregistré, toute stratégie confondue (+ 7% de variation de réflectivité lors de l'injection de la thrombine avec APT2-bio et la streptavidine sur les plots APT1). Ceci était prévisible si l'on considère la capacité d'APT1 d'interagir avec les deux exosites de la thrombine. La co-injection de la thrombine avec APT2 bloque l'exosite II mais laisse la possibilité au complexe d'interagir avec APT1 greffé sur la puce *via* l'exosite I. Au contraire, la co-injection de la thrombine avec APT1 peut bloquer l'exosite II de certaines molécules de thrombine, et empêcher ainsi l'interaction de ces complexes avec APT2 greffé sur la puce.

D'après nos résultats, le protocole d'amplification le plus efficace est celui qui consiste à utiliser APT1 comme élément sonde greffé à la surface du biocapteur et à injecter simultanément la thrombine avec APT2 et l'élément amplificateur en solution. Cependant l'autre stratégie d'amplification qui consiste à injecter d'abord la thrombine, puis l'aptamère avec l'élément amplificateur dans un second temps seulement (protocoles P4 et P7), moins

efficace dans notre étude, peut se révéler utile dans certaines conditions de détection plus difficiles. Il est par exemple possible d'imaginer que ce protocole permettra de détecter plus spécifiquement la thrombine dans un échantillon complexe, notamment des échantillons sanguins. Notre biopuce n'a pour l'instant été caractérisée que dans un milieu simple tamponné mais lorsque l'on cherche à mettre au point un biocapteur dans un but de diagnostic (ce qui n'était pas le but final de cette thèse et n'a donc pas été poursuivi ici), il ne faut pas perdre de vue que l'on ne réalise jamais des analyses sur des milieux aussi simples. En l'occurrence la thrombine est naturellement présente dans le sang, qui est un milieu autrement plus complexe qu'un tampon : il contient énormément d'éléments différents susceptibles d'interagir de manière non spécifique avec notre capteur. Le risque d'utiliser un outil SPR comme outil de détection est alors de ne pas pouvoir identifier le signal spécifique, dû à la présence de thrombine, au milieu du signal non spécifique généré par le passage du milieu complexe sur la puce. Il a déjà été relevé que, jusqu'à maintenant, trop peu d'études ont montré l'efficacité de la SPRi à détecter spécifiquement des analytes en milieu biologique complexe (Scarano 2010). L'intérêt de l'amplification par un deuxième aptamère peut prendre ici tout son sens : il pourrait permettre de créer un signal spécifique retardé par rapport à l'injection de la thrombine dans le milieu complexe, alors que l'on est repassé dans un milieu plus simple, plus facilement analysable.

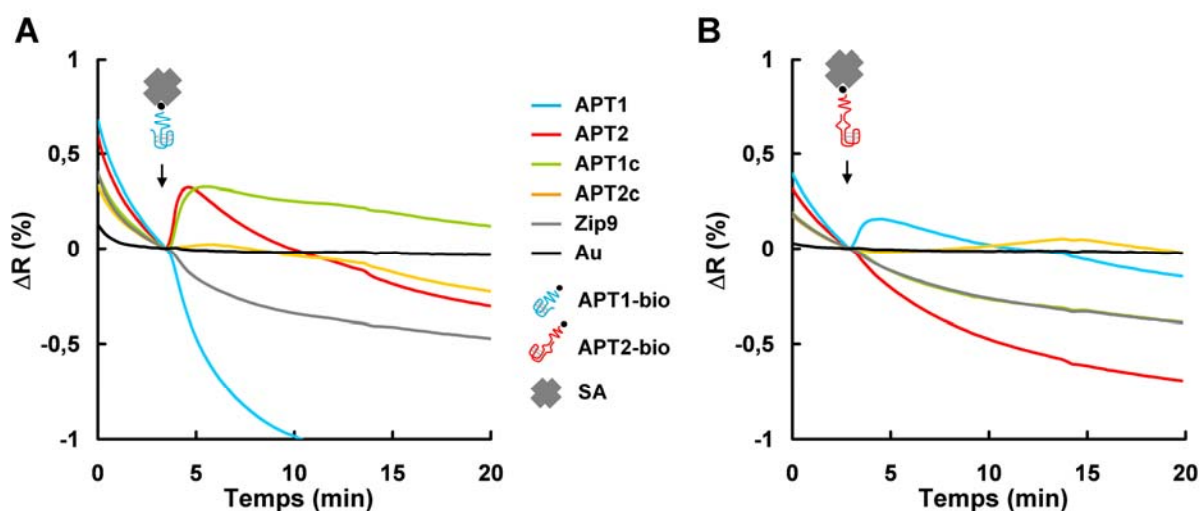
Afin de tester rapidement cette hypothèse, quelques expériences très simples ont été réalisées avec du sérum de veau fœtal dilué, utilisé comme modèle de milieu sanguin. 50 nM de thrombine ont ainsi été ajoutée à ce sérum dilué 10 fois dans notre tampon de course afin d'observer si la détection de la thrombine était toujours possible dans ces conditions (**Figure 3.9**).



**Figure 3.9** Variations de réflectivité (en %) enregistrées par SPRi pendant des injections de 50 nM de thrombine (THR) dans du sérum de veau fœtal (SVF) dilué 10x dans le tampon de course, suivies éventuellement de l'injection d'un aptamère secondaire biotinylé (APT1-bio ou APT2-bio) pré-complexé avec la streptavidine (SA) dans le tampon de course. Avant chaque injection de thrombine la régénération de la puce est assurée avec une injection NaCl 1 M.



Une première injection de thrombine dans le sérum dilué a d'abord été réalisée et permet de se rendre compte des nouvelles difficultés causées par le changement du milieu de détection : un saut d'indice important est bien sûr observé sur tous les plots du fait de l'écart important existant entre l'indice de réfraction du sérum et celui du tampon. Mais l'on observe que le signal détecté sur les plots fonctionnalisés par les sondes (aptamères ou contrôles) ne correspond pas seulement au saut d'indice enregistré sur l'or nu : de nombreuses interactions non spécifiques ont lieu et ne permettent pas de distinguer le signal spécifique de la thrombine sur les plots aptamères. La stratégie d'amplification a donc été mise en œuvre par la suite : un aptamère secondaire biotinylé lié à de la streptavidine est injecté durant la phase de dissociation qui suit l'injection de sérum dilué, suivant le même protocole que précédemment (protocoles P4 et P7 à la différence que toutes les injections réalisées sont ici des injections courtes, sans va-et-vient du tampon). Un détail des signaux est observable sur la **Figure 3.10**, où tous les signaux ont été remis à 0 juste avant le début de l'injection de l'aptamère secondaire (APT1-bio-SA en **A** et APT2-bio-SA en **B**).



**Figure 3.10** Détails des courbes de la Figure 3.9 avec remise à 0 des signaux juste avant l'injection simultanée de l'aptamère secondaire biotinylé APT1-bio (A) ou APT2-bio (B) pré-complexé avec la streptavidine (SA).

Cette stratégie semble fonctionner : un signal positif est enregistré seulement sur les plots où le sandwich a pu se construire (plots APT2 lors de l'injection APT1-bio-SA et plots APT1 lors de l'injection APT2-bio-SA), ainsi que sur les plots contrôles complémentaires de la séquence injectée (pour un contrôle plus pertinent la réponse de Zip9 a également été représentée ici afin de mieux représenter l'écart entre les signaux des plots négatifs où n'a lieu que de la dissociation et les plots où un signal positif de détection de la thrombine a lieu). Evidemment d'autres expériences de mise au point seraient ici nécessaires afin d'optimiser la détection et d'observer si le signal généré lors de l'ajout de l'aptamère secondaire est bien proportionnel à la concentration de thrombine présente lors de la première injection. Cependant il s'agissait ici simplement de prouver la mise en application possible de la formation de structures sandwich détectées par SPRI. A ce titre, l'augmentation de la spécificité du système provoquée par l'utilisation d'un aptamère secondaire peut se révéler importante dans le cas de détection en milieu complexe.

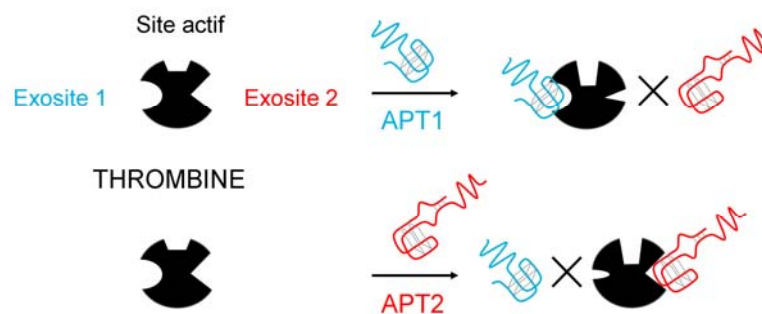
## 3.5 Détermination d'un effet allostérique inter-exosite

### 3.5.1 Etude bibliographique

L'occupation de l'un ou l'autre des exosites de la thrombine peut provoquer des changements allostériques sur le site actif de cette dernière, modifiant l'activité de la thrombine. Concernant l'exosite I, cette action a été prouvée par plusieurs études de cristallographie, de fluorescence ou analyse mutationnelle avec de l'hirudine et de la thrombomoduline (Jackman 1992; Vijayalakshmi 1994; Verhamme 2002; Rezaie 2003). L'exosite I sert ainsi de site d'interaction pour certains substrats et inhibiteurs de la thrombine, mais aussi comme régulateur de son activité par son effet allostérique (la fixation de la thrombomoduline sert ainsi par exemple à exacerber la reconnaissance des inhibiteurs de la thrombine (Yang 2003)). Concernant l'exosite II, l'interaction *via* ce dernier avec un fragment de la prothrombine (F2) provoque des changements de conformation du site actif, influence la régulation de l'activité de la thrombine par le calcium et réduit le taux d'inhibition de la thrombine par l'antithrombine III (Myrnel 1976; Walker 1979; Bock PE 1992; Liu 1994). Ceci montre que, comme pour l'exosite I, la fixation de ligands sur l'exosite II peut induire des changements de conformation de la thrombine et moduler son activité.

De façon moins claire, il est aussi possible qu'un effet allostérique régule l'activité entre les deux exosites, *i.e.* que l'occupation d'un des deux exosites modifie la capacité de liaison de l'autre exosite. Certains arguments ont été avancés dans ce sens (Liu 1991; Hogg 1996; Fredenburgh 1997; Liaw 1998) mais cette idée a également été plusieurs fois réfutée (Colwell 1998; Verhamme 2002).

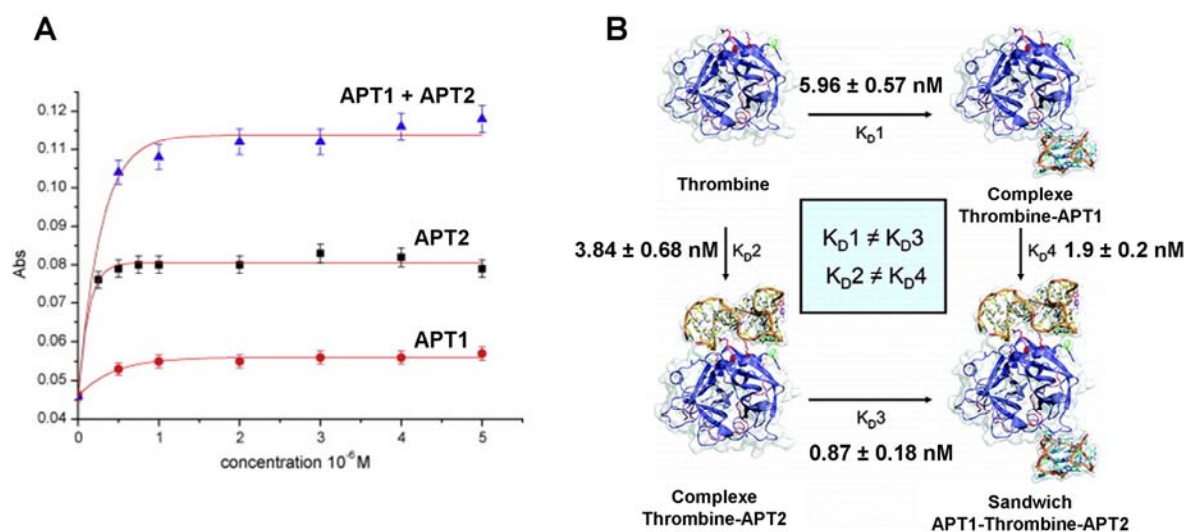
Beaucoup d'études se sont attachées à éclaircir les nombreux phénomènes d'allostérie intervenant dans la régulation de l'activité de la thrombine pour mieux comprendre son fonctionnement. Pour cela, différents ligands ont été considérés (la thrombomoduline, l'hirudine, un anticorps dirigé contre l'exosite II, le fragment F2 de la prothrombine, un monomère de fibrine...). L'existence des deux aptamères dirigés contre les deux exosites de la thrombine fournit deux outils de choix pour l'étude d'un éventuel effet allostérique inter-exosite encore peu évident (principe illustré sur la **Figure 3.11**). Deux études ont ainsi étudié ce phénomène en utilisant APT1 et APT2 simultanément.



**Figure 3.11** Représentation d'un effet allostérique négatif entre les deux exosites. La fixation d'un premier aptamère (APT1 sur l'exosite I ou APT2 sur l'exosite II) provoque un changement de conformation du site actif mais aussi de l'exosite opposé, qui empêche la fixation ultérieure d'un second aptamère.

La première étude (Zhou 2010) est basée sur l'étude de la vitesse d'hydrolyse d'un substrat chromogène par la thrombine en présence d'APT1 et/ou APT2. Utilisés séparément, les aptamères permettent en effet de catalyser la réaction de la thrombine (ce qui montre à nouveau l'effet allostérique réel entre les exosites et le site actif). Utilisés conjointement, si un effet allostérique négatif inter-exosite important était ressenti, aucune amélioration du taux d'hydrolyse ne serait détectée par rapport à l'utilisation d'un aptamère seul, la thrombine ne pouvant se lier qu'à un seul aptamère. Or on observe bien une nette augmentation de ce taux, supérieur à ceux obtenus par l'ajout des deux aptamères pris séparément (**Figure 3.12A**). L'étude en déduit qu'il n'existe pas d'effet allostérique négatif entre les deux exosites.

La deuxième étude (Olmsted 2011) semble, elle, montrer un effet allostérique inter-exosite positif en mesurant l'affinité entre la thrombine et les aptamères selon qu'elle soit, ou non, déjà pré-complexée avec l'un d'entre eux. Or elle prouve de manière surprenante que le  $K_D$  caractérisant l'interaction de la thrombine pré-complexée est systématiquement plus faible que celui de la thrombine seule (**Figure 3.12B**), traduisant l'augmentation d'affinité de la thrombine pour un aptamère lorsqu'elle est déjà pré-complexée avec un autre aptamère !



**Figure 3.12 (A)** Variation du taux d'hydrolyse d'un substrat chromogène AGAN par la thrombine en présence d'APT1 (●), d'APT2 (■) ou d'un mélange d'APT1 et APT2 (▲), issu de (Zhou 2010). La thrombine (1  $\mu$ M) a été préalablement incubée avec le ou les aptamères (ratio molaire 1:1) à 37°C pendant 5 minutes. La réaction est initiée par l'ajout d'AGAN ; 30 minutes plus tard la réaction est stoppée par l'ajout de 50% d'acide acétique. Chaque valeur représente la moyenne de 3 expériences et les barres d'erreurs obtenues sont représentées. **(B)** Schéma représentant l'existence des différents  $K_D$  caractérisant l'interaction de la thrombine avec les deux aptamères, seule ( $K_{D1}$  pour l'interaction avec APT1,  $K_{D2}$  pour l'interaction avec APT2) ou déjà pré-complexée avec l'un des aptamères ( $K_{D3}$  et  $K_{D4}$ ), d'après (Olmsted 2011).

D'après ces résultats, et particulièrement ceux d'Olmsted *et al.*, on s'attendrait donc à ce que la formation du sandwich soit en fait favorisée puisque la seconde interaction de l'aptamère secondaire avec la thrombine déjà liée à l'aptamère sonde greffé à la surface est plus forte que celle de la thrombine seule.

Cependant il faut noter que le modèle proposé par Olmsted *et al.* ne tient pas compte d'un possible manque de sélectivité d'APT1 pour l'exosite 1, non détecté dans leurs expériences mais bien observé par de nombreuses autres études ainsi que la notre. De plus ces résultats présentent des contradictions thermodynamiques claires. L'existence des deux chemins alternatifs menant à la même formation du triple complexe APT1-thrombine-APT2, soit par la voie débutant par la formation du complexe APT1-thrombine, soit par celle débutant par la formation du complexe APT2-thrombine, suggère l'égalité  $K_{D1}.K_{D4} = K_{D2}.K_{D3}$ . Or celle-ci n'est pas vérifiée pour les résultats donnés dans cette publication :  $K_{D1}.K_{D4} = 11.3 \pm 2.3 \text{ nM}^2$  et  $K_{D2}.K_{D3} = 3.34 \pm 1.3 \text{ nM}^2$ . La fixation d'APT1 sur les deux exosites de la thrombine pourrait expliquer cette inconsistance thermodynamique.  $K_{D1}$  ne peut être vue que comme une constante de dissociation apparente masquant l'existence de deux constantes de dissociation réelles correspondant à la fixation d'APT1 sur chacun des exosites. Ainsi l'effet allostérique positif révélé par Olmsted *et al.* est à considérer avec une extrême prudence et ne contre pas forcément des difficultés de formation du sandwich dues à la non-sélectivité d'APT1 pour les exosites de la thrombine.

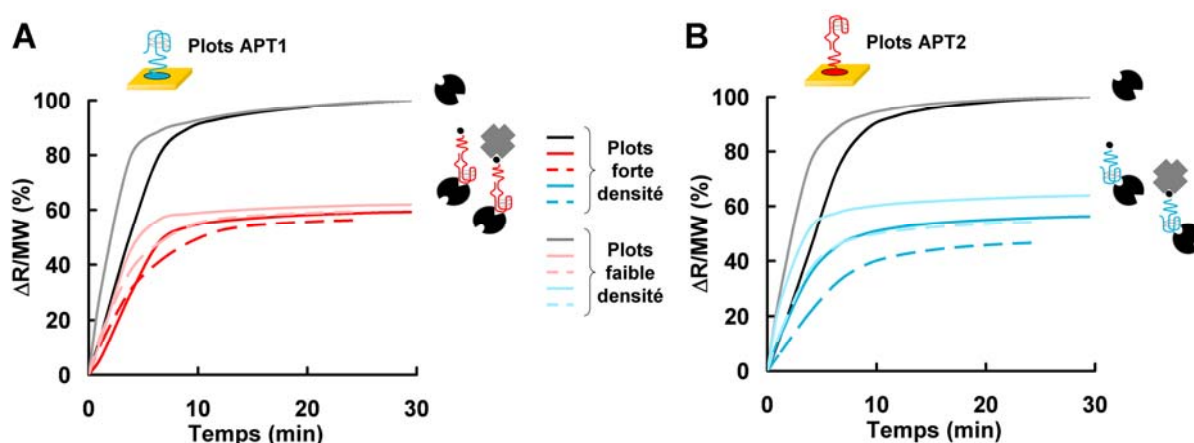
### 3.5.2 Résultats des expériences « sandwich »

De façon surprenante, les premiers tests de formation du sandwich (via l'injection séquentielle des éléments du sandwich, protocoles P2 et P3 de la **Figure 3.4**) n'ont pas permis d'observer la construction d'une telle structure sur la surface. Au contraire, nous avons observé une déstabilisation du pré-complexe formé par la thrombine liée à l'aptamère sonde greffé sur la puce lors de l'ajout de l'aptamère secondaire. Ce phénomène est particulièrement évident sur la **Figure 3.5** où les taux de dissociation de la thrombine liée à la surface sont présentés durant l'injection de tampon seul et comparés à l'injection des aptamères dilués dans le tampon. Dans les deux cas (thrombine liée à APT1 ou APT2 sur la surface) le taux de dissociation le plus lent est enregistré lors du passage de tampon seul, alors que le plus rapide correspond à l'injection de l'aptamère secondaire différent de celui déjà lié à la thrombine (APT2-bio sur les plots APT1 et APT1-bio sur les plots APT2). Le taux plus lent observé lors du passage du tampon seul peut s'expliquer par la capacité de la cible à se refixer sur la surface une fois dissociée d'une première molécule sonde, si la cible libérée n'est pas évacuée suffisamment rapidement de la surface (ceci revient alors à dire que la concentration en cible n'est pas réellement nulle à la surface de la puce). Augmenter le débit du tampon est connu pour pouvoir diminuer cet effet mais dans notre cas aucune différence ne fut observée à un débit de 250  $\mu\text{L}/\text{min}$  (soit 5 fois le débit habituel 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ ). Cet effet peut également être diminué *via* l'injection de la sonde en solution pour concurrencer les sondes greffées à la surface et assurer la liaison de la thrombine libérée avec les sondes présentes en solution plutôt que celles à la surface. Effectivement, la dissociation plus rapide observée lors de l'ajout de l'aptamère identique à celui greffé à la surface illustre ce phénomène de compétition. Or la dissociation observée lors de l'ajout de l'aptamère différent de celui greffé à la surface étant encore plus rapide, elle ne peut pas s'expliquer par cet unique phénomène de compétition. Ceci suggère bien une déstabilisation du complexe thrombine-aptamère greffé à la surface lors de la fixation du deuxième aptamère sur un autre exosite de la thrombine. Cet effet est observé quelque soit l'aptamère utilisé comme sonde et contredit donc le modèle d'effet allostérique inter-exosite positif proposé par Olmsted *et al.*

Cet effet pourrait par contre permettre d'expliquer pourquoi le nombre de complexes formés sur la puce diminue lorsque la thrombine est pré-complexée en solution avec l'aptamère secondaire biotinylé (lui-même lié ou non à la streptavidine), effet illustré sur la **Figure 3.8** où le signal a été normalisé par le poids du complexe injecté. Lorsque la thrombine est pré-complexée avec l'aptamère secondaire en solution différent de celui greffé sur la puce, le nombre de complexes formés sur la puce est diminué de moitié environ comparé à celui formé par la thrombine seule. Cet effet peut avoir plusieurs origines.

On pourrait d'abord soupçonner un encombrement stérique du complexe plus important lorsque la thrombine est pré-complexée à l'aptamère, modifiant l'accessibilité des sondes voisines lors de son accrochage sur la puce. Cependant cet effet dépendrait alors probablement de la densité de greffage des sondes : plus celle-ci serait faible (et donc plus les sondes seraient espacées) moins cet effet serait important. Or la **Figure 3.13** permet de

vérifier que ce n'est pas le cas. Sur cette figure sont en effet représentés les résultats obtenus sur les plots de forte densité déjà présentés précédemment mais également ceux des plots de plus faible densité (créés à partir de la solution de dépôt contenant une concentration en sonde plus faible de 10  $\mu\text{M}$ ). Pour pouvoir comparer l'effet sur les deux catégories de plots (faible et forte densité), le signal maximal obtenu lors de l'injection de thrombine seule a été re-normalisé à 100% pour chaque plot afin d'exprimer la capacité maximale de fixation des plots en termes de nombre de complexes accrochés. Sur les signaux bruts, ceux correspondant aux plots de forte densité étaient évidemment toujours supérieurs à ceux obtenus sur les plots de faible densité.



**Figure 3.13** Variations de réflectivité (en %) enregistrées par SPRi sur les plots APT1 (A) et APT2 (B) divisées par la masse moléculaire du complexe injecté, de façon à comparer le nombre de complexes adsorbés sur la puce, et normalisées ensuite par la valeur de saturation obtenue lors de l'injection THR seule (en noir et gris) pour chaque sorte de plots (APT1 et APT2, faible et forte densité), correspondant au nombre maximum de complexes pouvant se former sur chacun de ces plots (100%). Différentes injections sont considérées : celle de la thrombine seule, celle de la thrombine pré-complexée avec l'aptamère secondaire (APT1 en bleu et APT2 en rouge) et celle de la thrombine pré-complexée avec l'aptamère secondaire ET la streptavidine (en pointillés). Les traits foncés correspondent aux plots de forte densité (réalisés à partir d'une solution de dépôt contenant 20  $\mu\text{M}$  d'aptamère en solution) et les traits plus clairs correspondent aux plots de faible densité (réalisés à partir d'une solution de dépôt contenant 10  $\mu\text{M}$  d'aptamère en solution).

Il est ainsi visible que la densité de greffage ne semble pas (ou quasiment pas) jouer de rôle dans ce phénomène de diminution du nombre de complexes adsorbés : dans tous les cas (faible et forte densité de greffage, plots APT1 et plots APT2) le nombre de complexes formés lorsque la thrombine est pré-complexée en solution est deux fois moins important que lorsqu'elle est libre (entre 40 et 60%). Cet effet n'est donc pas lié à l'encombrement stérique. La non-sélectivité d'APT1 pour l'exosite I peut évidemment être une cause de cet effet : occupant l'exosite II de certaines molécules de thrombine, celles-ci ne sont alors plus libres d'interagir avec APT2. Mais, combinés avec les résultats obtenus sur la dissociation des complexes de thrombine en présence ou absence de l'aptamère en solution, il est raisonnable de penser que la fixation d'un aptamère sur l'un des exosites diminue l'affinité de l'interaction du second exosite, sans l'annuler complètement, comme le montre tout de même la formation de quelques sandwichs complets détectés dans nos expériences et l'expérience précédente d'hydrolyse menée par Zhou *et al.*

### 3.6 Conclusion

Ce chapitre illustre particulièrement l'intérêt de la technique de détection SPRi couplée aux aptamères pour investiguer les interactions se déroulant entre ces derniers et leur cible. Dans le cas particulier de la thrombine, celle-ci possède l'avantage non négligeable d'être la cible de deux aptamères pouvant interagir avec deux exosites différents de la protéine. Cet avantage a déjà été maintes fois exploité pour la mise au point de protocoles d'amplification ou de détection du signal sans marquage direct de la cible. Notre système a permis d'étudier la formation de cette structure complexe, dite « sandwich », et ses différentes configurations possibles. En particulier, les avantages de multiplexage (pour étudier en même temps la réponse indépendante des deux aptamères), de temps réel (pour accéder à la cinétique de la formation) et d'absence de marquage de la SPRi furent déterminants pour comprendre les mécanismes mis en œuvre lors de la formation de ces complexes et la dynamique de cette dernière.

Grâce à cette étude originale, nous avons ainsi pu confirmer ou réfuter certains résultats supposés ou établis de la littérature :

Nous avons ainsi confirmé la capacité d'APT1 à interagir avec les deux exosites de la thrombine, caractère que laissait déjà présupposer certaines études (Padmanabhan 1993; Pagano 2008), et surtout, caractère déjà exploité dans la mise au point de biocapteurs basés sur la formation d'un sandwich APT1-thrombine-APT1 (Li B 2008; Wang 2009; Ding 2010; Bai 2011), mais de façon plus surprenante complètement ignoré dans d'autres (Gronewold 2005; Edwards 2010; Zhou 2010; Olmsted 2011). Au contraire la sélectivité d'APT2 pour un seul exosite a bien été confirmée, caractère par ailleurs indispensable à l'étude de  $K_D$  menée au chapitre précédent.

La comparaison des protocoles différents testés avec notre système a permis d'établir clairement un protocole optimal d'amplification : celui-ci requiert la pré-incubation de la thrombine avec l'aptamère secondaire en présence du facteur d'amplification (ici la streptavidine) avant l'injection sur la puce. Cette injection simultanée semble favoriser la construction du sandwich complet et donc l'amplification maximale du signal. A cause de la faible sélectivité d'APT1, il est préférable d'utiliser ce dernier comme élément sonde en le greffant sur la surface et, par conséquent, d'utiliser APT2 comme aptamère secondaire d'amplification (le sandwich APT1-thrombine-APT1 n'ayant pu être amplifié au cours de nos expériences). Les performances de détection atteignables par l'emploi de cette stratégie n'ont pas été explorées ici mais au vu des résultats de cette première étude, il est évident qu'elles seraient encore meilleures que celles obtenues au chapitre 2 sans amplification. De plus, le remplacement de la streptavidine par d'autres éléments amplificateurs plus efficaces, telles que des nanobilles d'or, permettrait sans aucun doute d'améliorer encore ces performances.

L'utilisation d'une stratégie alternative de formation du sandwich en deux étapes pourrait par contre se révéler plus efficace dans le cas d'une détection en milieu complexe, comme le laisse entrevoir les très simples essais de détection en sérum dilué réalisés (mais non optimisés). Cette amplification pourrait alors, en sacrifiant certes les données cinétiques de l'interaction, aider à développer des protocoles de détection en conditions plus proches des

besoins réels des domaines biomédicaux et environnementaux qui travaillent avec des milieux complexes (sang, urine, sueur, matrice alimentaire...).

Enfin, l'absence de formation de complexes type sandwich lors de l'injection séquentielle des éléments du sandwich et plus encore la brusque accélération inattendue de la dissociation de la thrombine observée lors de l'injection de l'aptamère secondaire (au lieu de l'augmentation de signal espérée, traduisant la formation du sandwich) a conduit à la remise en question du modèle proposé par Olmsted *et al.* où un effet allostérique positif entre les deux exosites existe. Au contraire nos résultats semblent pencher en faveur de l'hypothèse d'une allostérie négative inter-exosite, même si le manque de sélectivité d'APT1 pour l'exosite I ne permet pas une analyse précise du phénomène.

En conclusion, l'existence d'un aptamère dirigé spécifiquement et surtout exclusivement contre l'exosite I de la thrombine pourrait grandement améliorer la formation et donc la détection du sandwich, ainsi qu'aider à clarifier un éventuel effet allostérique inter-exosite. Etant donné l'excellente sélectivité d'APT2 pour l'exosite II, l'effort à fournir ne porte que sur l'exosite I. Une voie possible pour l'obtention de cet aptamère plus sélectif est la sélection d'un nouvel aptamère, en utilisant pour cible lors du procédé SELEX la thrombine déjà complexée avec APT2, ne laissant disponible que l'exosite I pour une nouvelle interaction. Cependant une méthode encore plus simple (étant donné la relative complexité du procédé SELEX à mettre en œuvre pour la sélection d'un aptamère dirigé contre une protéine déjà liée à une séquence ADN, sans que cette séquence ne perturbe la sélection) pourrait être la modification d'APT1 afin d'améliorer sa sélectivité. En effet une étude récente de cristallographie étudiant l'interaction de la thrombine avec un analogue modifié d'APT1, mTBA (conçu en 2006 à partir d'une inversion 5'-5' du sens de polarité dans la séquence : 3'GGT<sup>5'</sup>-5'TGGTGTGGTTGG<sup>3'</sup> (Martino 2006)), semble démontrer que ce nouvel aptamère n'interagit pas du tout avec l'exosite II (Russo Krauss 2011). Il serait donc extrêmement intéressant d'utiliser cet aptamère modifié sur nos biopuces en parallèle d'APT1 et APT2 pour tester et comparer la formation du sandwich avec ces différents aptamère.





# 4

## VERS UNE ÉTUDE DES INTERACTIONS NATURELLES DE LA THROMBINE

Après avoir servi d'outil d'étude de l'interaction de la thrombine avec l'un, l'autre ou les deux aptamères APT1 et APT2 au cours des chapitres précédents, les biopuces ont finalement été utilisées pour explorer les interactions et les phénomènes physiologiques impliquant la thrombine en tant qu'acteur de la cascade de la coagulation. Nous avons en effet déjà évoqué le rôle important de la thrombine dans cette cascade et les multiples réactions dans lesquelles elle assurait une fonction déterminante pour influencer sur cette cascade, à la fois dans le sens pro- mais également dans le sens anticoagulant.

Pour assurer ces différentes fonctions, la thrombine possède une large gamme de substrats et de partenaires avec lesquels elle est capable d'interagir spécifiquement. Si sa forme est assez semblable à celle des autres membres de la famille des Sérines-protéases, en particulier au niveau du site actif, sa structure diffère de celles de ses cousines notamment par la présence des deux domaines électropositifs, exosite I et exosite II. Et si ce sont spécifiquement ces domaines qui sont impliqués dans l'interaction de la thrombine avec les aptamères APT1 et APT2, la reconnaissance entre la thrombine et ses substrats fait également et invariablement intervenir l'un ou l'autre de ces exosites (Huntington 2005).

Notre biopuce, en tant que plateforme de reconnaissance de la thrombine où figurent simultanément des éléments d'accrochage *via* l'exosite I et l'exosite II, pourrait de fait permettre d'étudier ces interactions. C'est cet aspect plus exploratoire que ce chapitre se propose d'aborder ici.

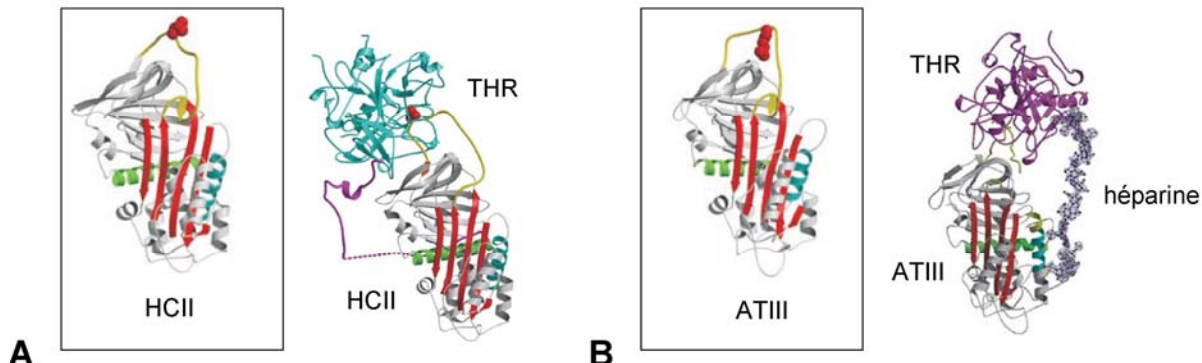
Dans un premier temps il se focalisera sur le mécanisme d'inhibition de la thrombine par ses inhibiteurs naturels que sont l'antithrombine III et le cofacteur II de l'héparine avant de

s'intéresser d'une manière plus approfondie au mécanisme de formation de la thrombine, à partir de son précurseur, la prothrombine.

## 4.1 Des inhibiteurs naturels de la thrombine

### 4.1.1 Le mécanisme d'inhibition de la thrombine

L'inhibition finale de la thrombine à la fin de la cascade de la coagulation est principalement assurée par deux membres de la famille des serpins, protéines capables d'inhiber des protéases (Silverman 2001). Le cofacteur II de l'héparine (HCII) et l'antithrombine III (ATIII) sont les deux seuls inhibiteurs spécifiques de la thrombine en circulation dans le réseau sanguin et sont similaires sur bien des aspects (**Figure 4.1**). Ces deux protéines sont naturellement présentes dans le plasma à des concentrations micromolaires, elles sont toutes les deux des serpins et assurent ainsi l'inhibition de la thrombine via un mécanisme irréversible de liaison covalente avec le site actif de leur cible (Huntington 2000), elles sont capables d'inhiber la thrombine à des taux très supérieurs en présence de glycosaminoglycanes (GAGs) tels que l'héparine (taux d'inhibition multiplié environ par 1000 (Adams 2006)) et enfin, les deux peuvent utiliser les exosites de la thrombine afin de reconnaître efficacement la thrombine (Huntington 2005).



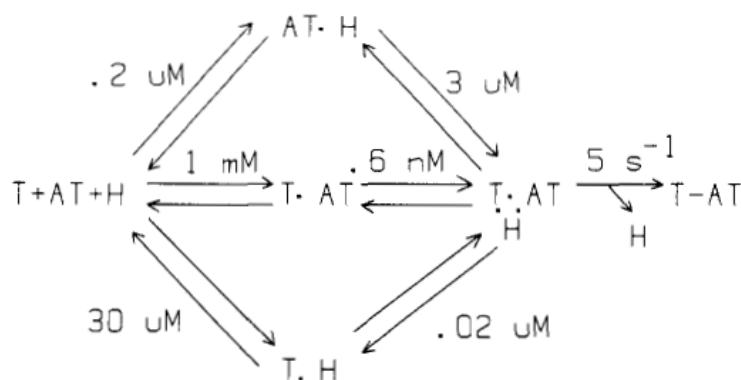
**Figure 4.1** Structures natives des serpins (**A**) cofacteur II de l'héparine (HCII) et (**B**) antithrombine III (ATIII), seules ou en interaction avec l'héparine et/ou la thrombine (THR). Issues de (Baglin 2002; Li 2004)

ATIII (masse moléculaire 58 000 Da, concentration dans le plasma 2,7  $\mu\text{M}$  (Murano 1980)) est le principal inhibiteur circulant des protéases de la cascade de coagulation, parmi lesquelles figure la thrombine. Sa haute concentration dans le sang est contrebalancée par une affinité limitée pour ses cibles, laquelle est largement amplifiée en présence d'héparine ou GAGs affiliés. L'inhibition de la thrombine par ATIII est un processus en deux étapes, pendant lequel un complexe initialement réversible est converti en un complexe stable ATIII-thrombine au cours d'une réaction du premier ordre (Sheehan 1994). L'héparine accroît l'affinité du complexe initial de presque 3 ordres de grandeur (Olson 1982).

L'héparine est un mélange de différents polymères non ramifiés, sulfatés (et donc fortement chargés négativement dans des conditions physiologiques), essentiellement constitués d'unités disaccharidiques (deux monomères constitutifs des glucides) trisulfatées. ATIII interagit avec l'héparine avec une extrême spécificité pour un motif de pentasaccharide présent sur 1/3 des chaînes d'héparine environ (Casu 1981; Lindahl 1981) ce qui explique l'utilisation thérapeutique de l'héparine pour son pouvoir anticoagulant, conséquence principale de son interaction avec ATIII (Rosenberg 1978). L'héparine active en effet ATIII *via* deux mécanismes différents : elle modifie d'une part de façon allostérique la structure d'ATIII et elle constitue d'autre part une matrice support, sur laquelle l'inhibiteur et la protéase peuvent interagir simultanément. Les cinétiques d'inhibition de la thrombine par ATIII en présence d'héparine, ainsi que la taille minimale des chaînes d'héparine (18 monosaccharides) nécessaires à l'amplification de cette inhibition (Olson 1982), suggèrent l'accrochage simultané d'ATIII et de la thrombine sur une unique molécule d'héparine : au contraire de l'inhibition du facteur Xa par ATIII, le changement structural induit par la fixation d'ATIII sur l'héparine ne contribue que peu à l'accélération de l'inhibition de la thrombine (Olson 1992). C'est le caractère de matrice support favorisant l'interaction entre la thrombine et ATIII qui joue un rôle important, car de son côté, la thrombine est également capable d'interagir avec l'héparine. Mais contrairement à la manière très spécifique par laquelle ATIII reconnaît un motif précis avec une haute affinité, la reconnaissance entre la thrombine et l'héparine s'établit par le biais d'interactions électrostatiques non spécifiques entre l'exosite II de la thrombine chargé positivement et les chaînes de polymère fortement chargées négativement (Carter 2005), lorsque ces chaînes sont suffisamment longues ( $> 6$  saccharides) (Olson 1991b; Sheehan 1994). La constante de dissociation apparente caractérisant l'interaction thrombine-héparine est de l'ordre de 6-10  $\mu\text{M}$  (Olson 1991b; Maaroufi 1997), soit plus d'un ordre de grandeur au dessus du  $K_D$  de l'interaction ATIII-héparine ( $\sim 0,1-0,4 \mu\text{M}$ , valeur qui varie selon les fractions d'héparine considérées, en fonction de la représentation du motif pentasaccharide responsable de l'affinité spécifique avec ATIII (Olson 1988; Maaroufi 1997)).

L'effet matrice peut être compris en tant que diffusion améliorée (Olson 1991a) avec ATIII se liant de façon très spécifique sur les motifs pentasaccharides des longues chaînes d'héparine et la thrombine se translatant sur ces chaînes linéaires *via* une interaction plus faible avec l'exosite II, jusqu'à rencontrer l'inhibiteur ATIII déjà complexé. Elle est alors capable de former un complexe stable avec ATIII et de se détacher de l'héparine, afin que celle-ci soit ensuite recyclée pour catalyser une nouvelle interaction.

L'ensemble des réactions possibles de reconnaissance précédant la réaction de stabilisation du complexe thrombine-ATIII (dont la vitesse n'est pas modifiée par la présence d'héparine) sont récapitulées sur la **Figure 4.2**, où sont également indiquées les valeurs des constantes d'affinité apparentes déterminées par Steven T. Olson (Olson 1988).



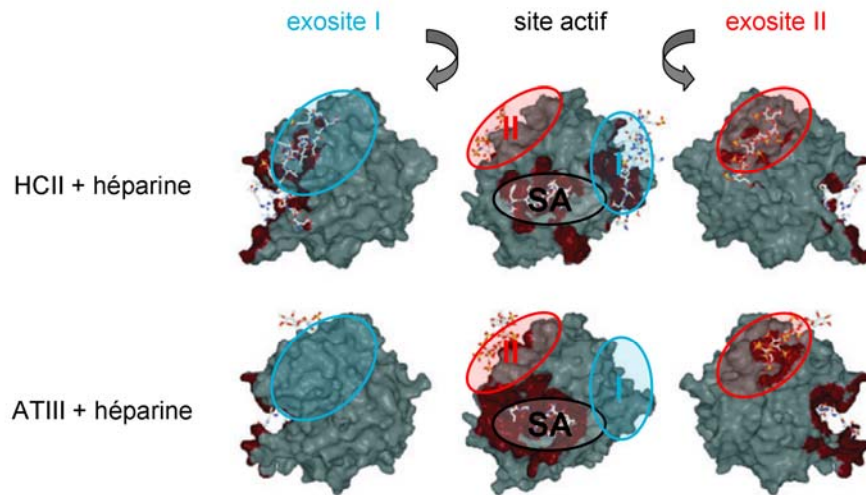
**Figure 4.2** Schéma des différentes réactions de reconnaissance conduisant à la formation d'un complexe ternaire antithrombine III (AT) – thrombine (T) – héparine (H). Issu de (Olson 1988). Les constantes d'affinité apparentes sont indiquées au dessus de chaque réaction réversible.

HCII (masse moléculaire 65 600 Da, concentration dans le plasma  $1,4 \mu\text{M}$  (Tollefsen 1982)) est le second inhibiteur circulant de la thrombine, identifié après ATIII (d'où son nom cofacteur II de l'héparine, à l'époque où ATIII était parfois appelé cofacteur de l'héparine) (Tollefsen 1982). Des données cinétiques d'inhibition montrent que cette réaction est assimilable à une réaction du second ordre essentiellement irréversible, où le taux de formation du complexe HCII-thrombine est proportionnel aux concentrations des deux protéines. Même si la valeur de ce taux diffère selon les études réalisées, il est systématiquement plus faible que celui de la formation du complexe ATIII-thrombine, d'un facteur 4 à 20 fois plus faible (Maaroufi 1997). Ce taux est multiplié par un facteur d'au moins 1000 en présence d'héparine (Tollefsen 1982).

Bien que sa structure soit très similaire à celle d'ATIII et que ses capacités d'inhibition de la thrombine soient également largement amplifiées en présence d'héparine, le principe de cette amplification est légèrement différent de celui d'ATIII + héparine. Il est probable qu'un changement structural provoqué par la fixation de l'héparine (ou autre GAG sulfaté) joue cette fois le rôle le plus important dans l'inhibition de la thrombine, en favorisant la reconnaissance HCII-thrombine, même lorsque la longueur des chaînes d'héparine est relativement courte (10 saccharides) et ne permet pas la fixation des deux protéines sur la même molécule (O'Keeffe 2004). Celle-ci fait intervenir une interaction avec l'exosite I de la thrombine, probablement à l'origine de la sélectivité constatée d'HCII pour la thrombine, contrairement à ATIII qui est capable d'inhiber d'autres protéases de la coagulation (et en particulier le facteur Xa (Craig 1989)). Brièvement, la liaison d'HCII avec des GAGs présents à la surface des cellules provoque une modification allostérique de la protéine, incluant l'expulsion de la boucle du centre actif et la libération de la séquence capable de reconnaître l'exosite I de la thrombine. Cette séquence flexible est alors libre de recruter les molécules de thrombine dont le site actif est ensuite associé et fortement modifié par la liaison avec la boucle du centre actif d'HCII, dont l'accessibilité a été augmentée (Baglin 2002). Cependant, contrairement à ATIII, aucun motif spécifique responsable d'une haute affinité entre HCII et les GAGs n'a été identifié, même s'il n'est toujours pas exclu que ce motif existe (O'Keeffe 2004). Ainsi l'affinité entre HCII et l'héparine augmente simplement avec la longueur des chaînes sélectionnées, mais reste globalement bien plus faible que celle mesurée entre ATIII

et l'héparine contenant le motif pentasaccharide spécifique à ATIII : de quelques  $\mu\text{M}$  à plusieurs dizaines (Maaroufi 1997; O'Keeffe 2004).

L'interaction de la thrombine avec ses inhibiteurs en présence d'héparine fait toujours intervenir au moins l'un des deux exosites de la thrombine (l'exosite II pour l'interaction électrostatique avec l'héparine, l'exosite I capable d'interagir avec HCII lorsque celui-ci est activé) et peut modifier profondément sa structure comme des études cristallographiques l'ont démontré (**Figure 4.3**).



**Figure 4.3** Identification par cristallographie des interactions entre la thrombine et ses inhibiteurs. Issu de (Huntington 2005). La thrombine est représentée dans 3 orientations différentes : dans l'orientation standard centrée sur le site actif SA (au centre), tournée de  $-90^\circ$  pour une vue centrée sur l'exosite I (à gauche) et tournée de  $+90^\circ$  pour une vue centrée sur l'exosite II (à droite). Les zones colorées en pourpre sur la thrombine indiquent les surfaces de la protéine distantes de moins de 4 Å des résidus présents sur les substrats ou cofacteurs de la thrombine. Les interactions avec HCII et l'héparine sont représentées en haut, celles avec ATIII et l'héparine en bas.

Sachant cela, des expériences préliminaires furent réalisées sur nos biopuces à aptamères afin de déterminer si ce genre d'interaction était observable *via* un changement d'affinité de la thrombine complexée pour l'un ou les deux aptamères APT1 et APT2, ou *via* la formation d'un assemblage complexe de type sandwich entre l'un des aptamères, la thrombine et l'inhibiteur et/ou l'héparine sur la puce.

#### 4.1.2 Conditions expérimentales

Les biopuces utilisées pour réaliser ces expériences sont identiques à celles présentées dans le chapitre 2, avec Zip7 utilisé comme contrôle et les séquences APT1 et APT2 présentes à faible ou forte densité de greffage. Les résultats présentés dans la suite correspondent aux moyennes des signaux enregistrés sur les 3 répliquats des plots forte densité, corrigés *via* la soustraction du signal obtenu sur un plot contrôle Zip7.

La thrombine est injectée à une concentration de 50 nM, toujours inférieure à celle d'ATIII et HCII (en général 100 nM). L'héparine utilisée (Hep) est un échantillon commercial

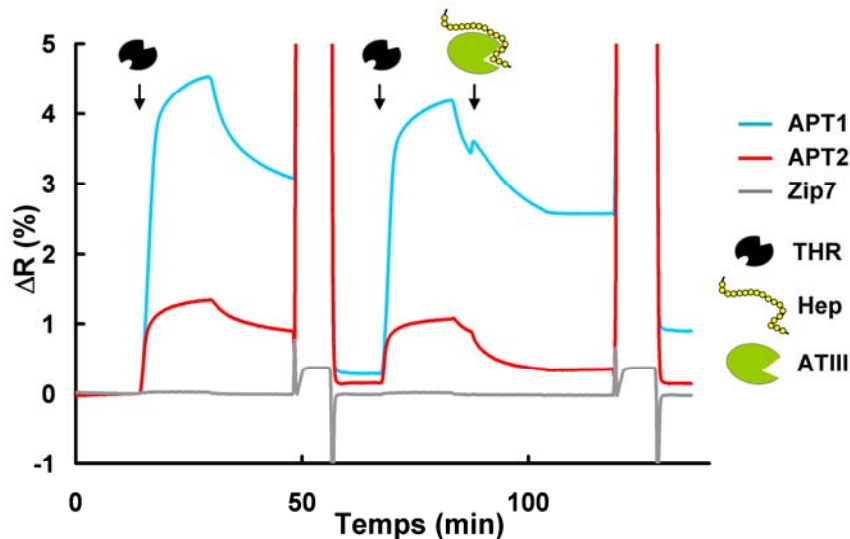
(Sigma-Aldrich, France) d'héparine non fractionnée : la masse (proportionnelle à la longueur) des chaînes peut varier entre 6 et 30 kDa mais la plupart ont un poids moléculaire de 17-19 kDa. Son activité est de 210 U.S.P/mg (l'unité U.S.P *United States Pharmacopeia* est une mesure du pouvoir anticoagulant au vu de son action sur ATIII). D'après les indications du fabricant, la quantité nécessaire pour bloquer la coagulation est comprise entre 20 et 50 unités par mL de sang. Dans le cadre de nos expériences elle fut toujours injectée à une concentration de 50 ou 100 U.S.P/mL, dans le tampon de course (100 U.S.P/mL correspond à une concentration molaire d'environ 25  $\mu$ M si l'on considère la masse moléculaire moyenne 18 kDa pour une molécule d'héparine).

Le protocole de détection dépend de la stratégie employée (injections séquentielles ou simultanées) mais reproduit toujours les paramètres suivant :

- Le tampon de course est délivré à un débit de 50  $\mu$ L/min. Les injections réalisées sont des injections « courtes » à débit 50  $\mu$ L/min constant, d'une durée de 15 minutes.
- La régénération de la puce est toujours réalisée avant une injection de thrombine par une injection courte de sel NaCl 1M de 8 minutes. Dans cette partie, cette injection est souvent suivie d'une injection d'hydroxyde de sodium NaOH 50 mM de 2-3 minutes afin d'assurer une régénération plus complète de la puce. Il est également à noter que l'emploi de NaOH comme solution de régénération semble avoir un effet bénéfique sur le maintien et la reproductibilité du signal thrombine au cours du temps.
- De la même façon que lors des expériences du chapitre 2, la protéine cyt c à une concentration finale fixe de 500 nM est ajoutée *systématiquement* à toutes les solutions d'injections protéiques. Par soucis de concision, elle n'est plus mentionnée ultérieurement mais est toujours présente.

#### 4.1.3 Etude de l'interaction thrombine-antithrombine III-héparine

Des injections successives de thrombine et ATIII+Hep furent d'abord réalisées, afin d'observer s'il était possible de détecter la formation d'un complexe quaternaire APT-THR-ATIII-Hep sur la puce et s'il existait des différences de comportement selon que l'aptamère considéré soit APT1 ou APT2 (**Figure 4.4**). Les concentrations d'ATIII (50 nM) et Hep (50 U.S.P/mL) injectées sont telles que quasiment la totalité des molécules d'ATIII devraient être précomplexées avec l'héparine en solution, avec un large excès d'héparine.



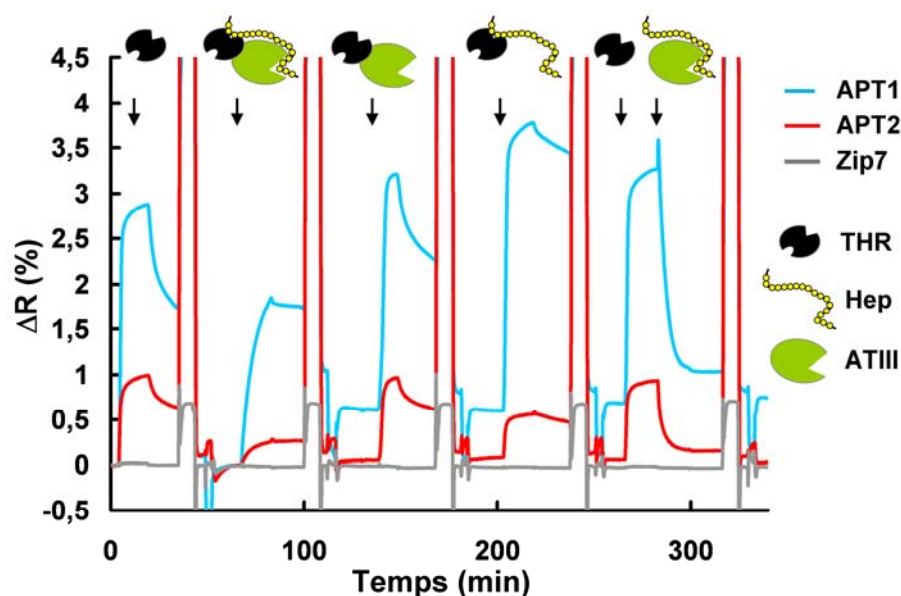
**Figure 4.4** Injections successives de thrombine (THR) 50 nM et de mélange antithrombine III (ATIII) 50 nM + héparine (Hep) 50 U.S.P/mL sur la biopuce. Avant chaque injection de thrombine, la biopuce est régénérée avec une injection NaCl 1M.

On observe effectivement une différence de signal entre les plots APT1 et APT2. Sur les plots APT2, la dissociation est accélérée lors de la seconde injection ATIII+Hep. Cela est peu surprenant vu que l'exosite II de la thrombine est impliqué dans l'interaction avec APT2 et dans l'interaction avec l'héparine, éventuellement précomplexée avec ATIII (**Figure 4.3**). Nous sommes ainsi capables d'observer le phénomène de compétition qui en résulte sur la biopuce.

Sur les plots APT1 où la thrombine est fixée principalement *via* une interaction avec l'exosite I, le signal est sensiblement différent. Une légère augmentation de signal (+ 0.13 %) est enregistrée au tout début de la seconde injection, puis la dissociation de la thrombine reprend le dessus immédiatement.

Afin d'explorer plus en détail les interactions à l'œuvre en présence d'aptamère, thrombine, ATIII et héparine, différentes injections simultanées ont également été réalisées ultérieurement, au cours d'une autre expérience (**Figure 4.5**). Des injections contrôles ATIII 100 nM, Hep 100 U.S.P/mL et ATIII 100 nM + Hep 100 U.S.P/mL ont par ailleurs été testées sur la biopuce et n'ont donné aucun signal spécifique : seul un signal de type « saut d'indice », toujours inférieur à 0.5 %, a été enregistré de façon similaire sur tous les plots.





**Figure 4.5** Variations de réflectivité (en %) enregistrées par SPRi lors d'injections successives ou simultanées de thrombine (THR) / antithrombine III (ATIII) / héparine (Hep). Première injection : THR 50 nM. Deuxième injection : THR 50 nM + ATIII 100 nM + Hep 100 U.S.P/mL. Troisième injection : THR 50 nM + ATIII 100 nM (durée d'injection 10 min). Quatrième injection : THR 50 nM + Hep 100 U.S.P/mL. Cinquième injection : THR 50 nM immédiatement suivie d'une injection ATIII 100 nM + Hep 100 U.S.P/mL. Avant chaque injection de thrombine la régénération de la puce est assurée avec une injection NaCl 1 M suivie d'une injection NaOH 50 mM.

Le dernier protocole réalisé sur la **Figure 4.5** reproduit le protocole en deux étapes réalisé précédemment sur la **Figure 4.4** mais en doublant les concentrations d'ATIII et d'héparine, et en injectant le mélange ATIII+Hep immédiatement après la fin de l'injection de thrombine. L'augmentation initiale de signal enregistrée spécifiquement sur les plots APT1 est alors plus élevée (+ 0.3 %) mais la dissociation qui suit ce premier saut est également plus rapide. Les trois co-injections précédentes de thrombine avec l'un des deux ou les deux autres composants du complexe ternaire THR-APTIII-Hep permettent de mieux apprécier l'influence des différents éléments. Ces co-injections sont réalisées sur la puce directement après le mélange en solution des différents éléments.

La co-injection THR+ATIII donne des signaux quasiment identiques à l'injection de thrombine seule sur les deux catégories de plot APT1 et APT2. Encore une fois, cela est peu étonnant si l'on sait que l'affinité du complexe initial THR-ATIII est très faible, avec une constante de dissociation de 1 mM d'après Steven T. Olson (**Figure 4.2**) : les molécules de thrombine ne sont en fait quasiment pas complexées avec ATIII.

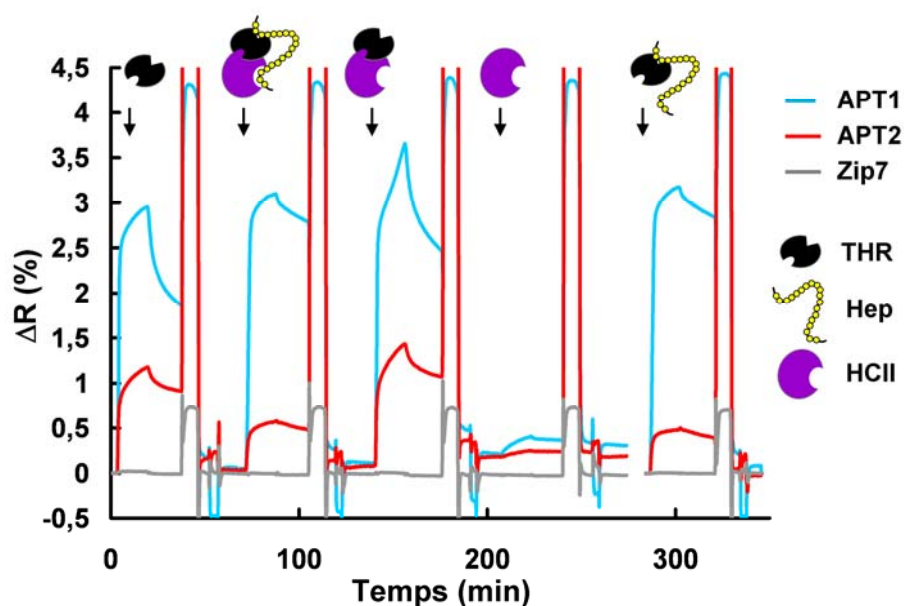
La co-injection THR+Hep provoque des signaux différents : la prise de signal sur les plots APT2 est diminuée de moitié (+ 0.5 % contre + 1 % pour l'injection de thrombine seule) ce qui est en accord avec une compétition au moins partielle entre APT2 et l'héparine pour interagir avec l'exosite II de la thrombine. Le signal est par contre légèrement supérieur sur les plots APT1 ce qui montre qu'au moins une petite partie de la thrombine qui interagit avec APT1 est bien complexée avec l'héparine, et qu'une construction APT1-THR-Hep est possible sur la puce. De façon plus remarquable, l'on observe que la dissociation du complexe avec APT1 à la fin de l'injection est bien plus faible qu'à la fin de l'injection de thrombine

seule (la baisse du signal est plus faible et plus lente) ! La présence d'héparine favorise donc probablement le maintien de l'interaction THR-APT1. Vu la longueur des chaînes d'héparine injectées, il est possible d'imaginer qu'une molécule d'héparine interagisse simultanément avec plusieurs molécules de thrombine fixées sur les plots et stabilise ainsi la couche de protéines fixée sur la puce.

La co-injection globale THR+ATIII+Hep donne encore des résultats différents. Le signal des plots APT2 (+ 0.26 %) est encore plus faible qu'avec l'injection THR+Hep et le signal sur les plots APT1 est cette fois plus faible et plus lent que lors de l'injection de thrombine seule. Il est donc très probable que l'ajout d'héparine ait effectivement permis une augmentation considérable du taux d'inhibition de la thrombine par ATIII. Il est cependant difficile de déterminer la nature des complexes formés sur la puce. Il ne s'agit visiblement pas que de thrombine seule, car l'allure des signaux ne ressemble pas à celle obtenue lors de la fixation de thrombine libre, même à une concentration plus réduite que 50 nM (*cf* les gammes de concentrations réalisées au chapitre 2 p.63). Surtout, on n'observe aucune dissociation à la fin de l'injection, et une dissociation seulement partielle sur les plots APT1 même après la régénération au sel ET celle à la soude. Le complexe formé sur la puce est donc bien plus résistant que celui formé par la thrombine et APT1. Il est possible d'imaginer que la modification allostérique subie par la thrombine lors de son inhibition par ATIII ait également modifié l'exosite I et la nature de son interaction possible avec APT1, la rendant plus lente à s'établir mais également plus résistante. L'exosite I étant le seul exosite non impliqué directement dans la reconnaissance du complexe ternaire THR-ATIII-Hep (**Figure 4.3**), il n'est pas étonnant que ce phénomène soit observable sur les plots APT1. Les plots APT2 ne peuvent, eux, interagir que de façon limitée avec la thrombine vu que l'exosite II est déjà impliqué directement dans la formation du complexe ternaire THR-ATIII-Hep.

#### 4.1.4 Etude de l'interaction thrombine-cofacteur II de l'héparine-héparine

Le même genre d'expérience fut finalement réalisé avec le cofacteur II de l'héparine (**Figure 4.6**).



**Figure 4.6** Variations de réflectivité (en %) enregistrées par SPRi lors d'injections successives ou simultanées de thrombine (THR) / cofacteur II de l'héparine (HCII) / héparine (Hep). Première injection : THR 50 nM. Deuxième injection : THR 50 nM + HCII 100 nM + Hep 100 U.S.P/mL. Troisième injection : THR 50 nM + HCII 100 nM. Quatrième injection : HCII 100 nM. Cinquième injection : THR 50 nM + Hep 100 U.S.P/mL issue de la **Figure 4.5**. Avant chaque injection de thrombine la régénération de la puce est assurée avec une injection NaCl 1 M suivie d'une injection NaOH 50 mM.

Cependant l'expérience fut moins concluante. On constate en effet que la co-injection globale THR+HCII+Hep donne exactement les mêmes signaux que la co-injection THR+Hep : l'influence de HCII n'est donc pas du tout visible. Or l'on sait que l'affinité entre la thrombine et HCII est probablement moins forte que celle entre la thrombine et ATIII, la vitesse d'inhibition d'HCII étant plus faible. La concentration d'inhibiteur injectée (100 nM) étant la même dans les deux cas, il est possible qu'elle soit trop faible dans le cas d'HCII pour inhiber efficacement la thrombine. Mais dans ce cas, il est plus surprenant de voir l'allure inhabituelle du signal obtenu lors de la co-injection THR+HCII. Le signal des plots APT1 semble continuer à augmenter linéairement, jusqu'à dépasser celui obtenu lors des autres injections, après une première phase de prise de signal rapide comparable à celle de thrombine seule. D'autres injections pour approfondir et mieux comprendre ce phénomène (à moins qu'il ne s'agisse d'un artefact) seraient sans doute nécessaires.

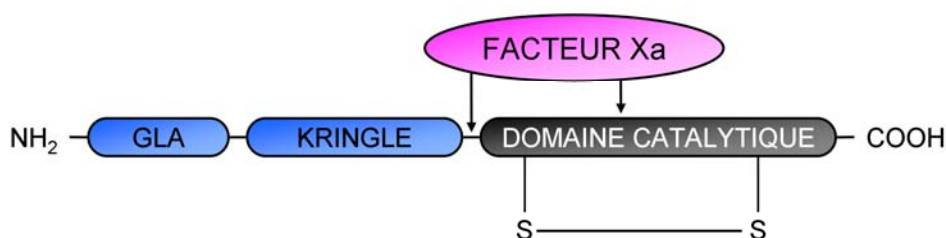
Ces expériences sont malgré tout des expériences préliminaires intéressantes, qu'il conviendrait d'enrichir en explorant une gamme de concentrations pertinentes de chaque élément impliqué dans l'inhibition de la thrombine. De plus, une étude relativement simple de l'influence de différents GAG ou différentes molécules d'héparine sur l'action d'ATIII et HCII pourrait éventuellement être réalisée. Ces résultats démontrent le potentiel de nos biopuces pour l'étude des interactions biologiques de la cible pour lesquelles les aptamères ont été sélectionnés. La thrombine ayant de multiples substrats et cofacteurs, les possibilités d'étude sont d'autant plus nombreuses et la pertinence d'une plateforme unique et d'un protocole simple pour l'exploration de ces interactions est d'autant plus importante. Les

biopuces à aptamères et le mode de transduction SPRi remplissent de tels critères. Un autre exemple en est fourni dans la partie suivante, qui s'attache à étudier plus en détail les conditions de transformation de la prothrombine aboutissant à la mise en circulation de la thrombine.

## 4.2 La transformation de la prothrombine

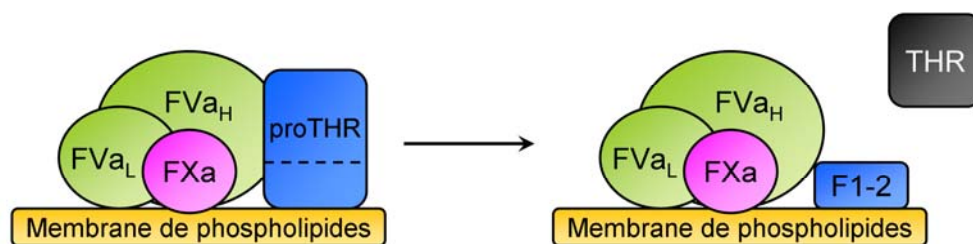
### 4.2.1 Le mécanisme de formation de la thrombine

Comme nous l'avons déjà rapidement exposé au chapitre 1 (p.31), la thrombine est une protéine issue de la transformation de son précurseur, le facteur II, également appelé prothrombine (proTHR). La prothrombine (masse moléculaire 72 000 Da, concentration dans le plasma 1.4  $\mu\text{M}$  (Mann 1976)) est une proenzyme qui circule dans le plasma dépourvue d'activité enzymatique avant d'être activée au cours du phénomène de coagulation *via* une protéolyse qui la transforme en thrombine. Durant cette activation, elle est clivée en deux endroits différents, aboutissant à la formation d'un « pro » fragment (fragment 1.2) et de la thrombine, composée de deux chaînes liées par un pont disulfure.



**Figure 4.7** Structure de la prothrombine. Le domaine catalytique est la région contenant les domaines reliés par un pont disulfure qui composeront la thrombine, une fois clivée par le facteur Xa. Les flèches indiquent approximativement les endroits où la prothrombine sera clivée lors de son activation. Le domaine gla fournit à la prothrombine sa capacité de fixation sur les membranes de phospholipides des cellules.

Cette protéolyse est assurée par le facteur Xa (masse moléculaire 46 000 Da). Bien que cette protéine (de la famille des sérines protéases, tout comme la thrombine) puisse indépendamment catalyser l'activation de la prothrombine, le taux d'activation peut être amplifié jusqu'à 300 000 fois en cas d'assemblage complet du complexe prothrombinase (Duga 2004). Ce complexe enzymatique est composé du facteur Xa (FXa) et du facteur Va (FVa) co-assemblés sur une surface de cellule composée de phospholipides (PL) chargés négativement, en présence d'ions calcium (**Figure 4.8**). Le facteur Va (masse moléculaire 168 000 Da) est un cofacteur du facteur Xa, responsable de la conversion rapide de la prothrombine en thrombine. C'est une protéine composée d'une chaîne lourde (94 000 Da) et d'une chaîne légère (74 000 Da) qui restent associées en présence d'ions calcium et qui interviennent toutes les deux dans la reconnaissance du facteur Xa (Kalafatis 1994). La prothrombine interagit, elle, seulement avec la chaîne lourde (Guinto 1984).



**Figure 4.8** Représentation du clivage de la prothrombine (proTHR) dans le complexe prothrombinase composé du facteur Xa (FXa), du facteur Va (divisé en deux sous unités FVa<sub>L</sub> et FVa<sub>H</sub>) et de phospholipides aboutissant à la libération de la thrombine (THR).

L'activité pro-coagulante du facteur Xa est stoppée *in vivo* par l'inactivation du cofacteur, le facteur Va, ou par l'inhibition directe du facteur Xa, par des inhibiteurs tels que l'antithrombine III (ATIII) (Craig 1989), après le désassemblage du complexe prothrombinase.

La formation de thrombine étant dépendante de plusieurs facteurs, il est intéressant de savoir si notre biopuce à aptamères permet d'observer ce phénomène et d'étudier l'influence de ces différents facteurs sur le taux et la vitesse de transformation de la prothrombine. Quelques expériences furent donc réalisées et sont présentées dans cette dernière partie du manuscrit.

## 4.2.2 Conditions expérimentales

Les biopuces utilisées pour réaliser ces expériences sont similaires à celles présentées dans le chapitre 2, avec Zip7 utilisé comme contrôle et les séquences APT1 et APT2 présentes à faible ou forte densité de greffage. Les résultats présentés dans la suite correspondent aux moyennes des signaux enregistrés sur les 4 réplicats des plots forte densité, la plupart du temps corrigés *via* la soustraction du signal obtenu sur un plot contrôle Zip7.

Le tampon de course a été légèrement modifié par l'ajout de CaCl<sub>2</sub> 2 mM afin d'assurer la présence d'ions calcium nécessaires à la formation efficace de la thrombine (tampon calcium : Tris-HCl 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, NaCl 120 mM, KCl 10 mM et CaCl<sub>2</sub> 2 mM, ajusté à pH 7,4, toujours préparé et filtré au laboratoire).

La thrombine et la prothrombine sont en général injectées à une concentration de 50 nM. La solution prothrombinase, inspirée de (Kretz 2006), est composée de PL 6 μM, FXa 0,25 nM et FVa 0,6 nM dilués dans le tampon calcium. Les phospholipides (PL) sont obtenus sous la forme d'une émulsion stable de phospholipides commerciale (Cryopep, France) contenant un mélange hautement purifié de phosphatidylcholine, phosphatidylsérine et sphingomyéline.

Le protocole de détection dépend de la série d'injections réalisées mais reproduit toujours les paramètres suivant :

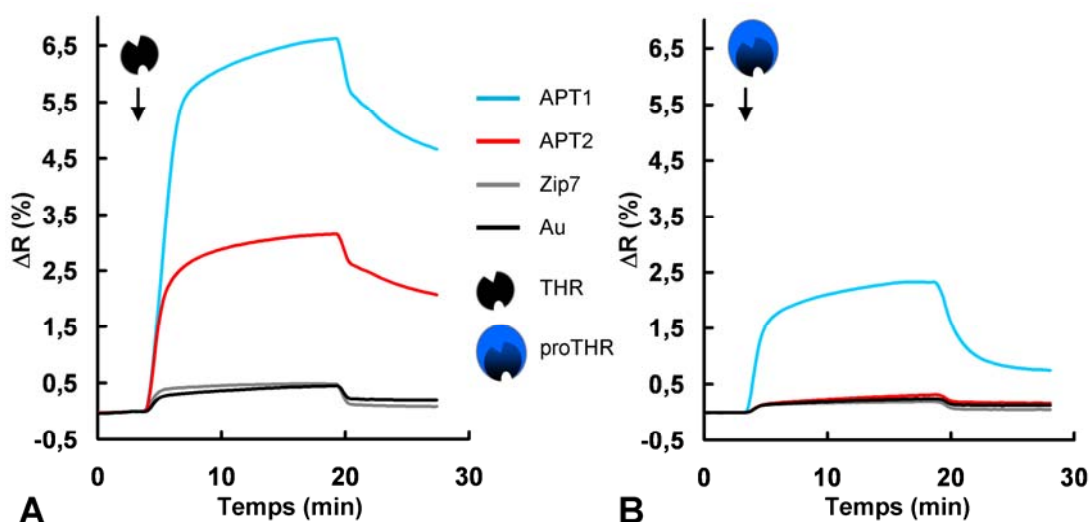
- Le tampon calcium est délivré à un débit de 50 μL/min. Les injections réalisées sont soit des injections « courtes » à débit 50μL/min constant, coupées au bout de 15

minutes, soit des injections « longues » : le mode « va et vient » (15  $\mu$ L de volume poussé, 10  $\mu$ L de volume aspiré) est activé 2 min 30 après le passage de la vanne d'injection en position « injection boucle » afin de permettre un remplissage complet de la chambre de réaction et une concentration constante en réactifs dans celle-ci. Les injections « longues » sont coupées au bout de 45 minutes, et le mode « va et vient » est immédiatement arrêté.

- La préparation des solutions à injecter est réalisée systématiquement juste avant l'injection sur la puce. La prothrombine est ajoutée en dernier au mélange et le basculement de la vanne d'injection en position « injection boucle » a lieu 2 min après.
- Dans cette partie, la régénération efficace de la puce est toujours réalisée avant une injection de thrombine ou prothrombine par une injection courte de NaOH 50 mM de 2-3 minutes.
- De la même façon que précédemment, la protéine cyt c à une concentration finale fixe de 500 nM est ajoutée systématiquement à toutes les solutions d'injections. Elle n'est plus mentionnée ultérieurement mais est toujours présente.

### 4.2.3 Détection et transformation de la prothrombine

L'un des premiers points à éclaircir pour justifier de la faisabilité de cette étude est le suivant : les aptamères APT1 et APT2 sont-ils capables d'interagir avec la prothrombine ? Si c'est le cas, et si cette interaction est comparable à celle développée avec la thrombine, il aurait été impossible de différencier la prothrombine de la thrombine sur nos biopuces. Il est donc absolument nécessaire que ces interactions soient différentes. La comparaison des signaux obtenus lors d'une injection de thrombine et lors d'une injection de prothrombine a rapidement permis de démontrer que c'était bien le cas **Figure 4.9**.



**Figure 4.9** Comparaison entre une injection courte de thrombine 50 nM (A) et une injection courte de prothrombine 50 nM (B) réalisées successivement dans le tampon calcium. Chaque courbe représente la moyenne des signaux obtenus sur 4 réplicats.

En réalité, ces signaux sont tout à fait en accord avec les informations que l'on trouve dans la littérature concernant l'existence et l'accessibilité des exosites sur la prothrombine.

D'après ces courbes, on constate qu'APT2 n'interagit pas du tout avec la prothrombine, les signaux des plots APT2 n'étant pas significativement différents de ceux des plots contrôles, contrairement au signal obtenu lors de l'injection de thrombine. Ceci implique que l'exosite II n'est pas accessible sur la prothrombine. D'autres arguments précédents appuyaient déjà cette hypothèse, comme l'affinité du domaine kringle isolé de la prothrombine pour cet exosite de la thrombine (Sheehan 1994) : c'est durant l'activation de la prothrombine que le domaine kringle est dissocié de la protéine, exposant alors l'exosite II à la surface de la thrombine.

Au contraire, les plots APT1 fournissent bien un signal spécifique lors de l'injection de prothrombine, même s'il est moins élevé que celui généré lors de l'injection de thrombine (presque 3 fois plus faible). Ceci corrobore d'autres études sur la présence d'un proexosite I sur la prothrombine, capable de reconnaître des ligands dirigés contre l'exosite I de la thrombine avec une affinité réduite (Anderson 2000). Ce proexosite développe une activité fonctionnelle durant la transformation de la prothrombine.

Ces caractéristiques ont déjà été étudiées dans le cas particulier des aptamères APT1 et APT2, *via* la détermination par un marquage fluorescent des constantes d'affinité caractérisant les interactions entre chacun des aptamères et les dérivés de la prothrombine (Kretz 2006). Le **Tableau 4.1** récapitule les valeurs des  $K_D$  obtenus au cours de cette étude pour les interactions avec la prothrombine et la thrombine.

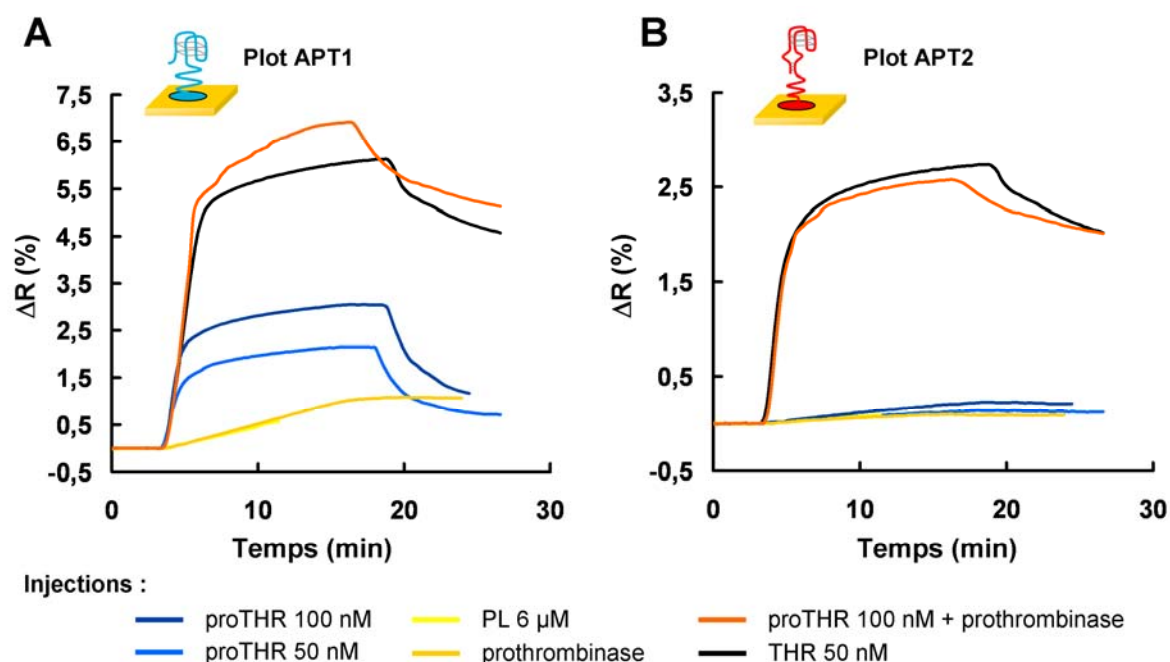
| Ligand       | $K_D$ (en nM) |                       |
|--------------|---------------|-----------------------|
|              | APT1          | APT2                  |
| Prothrombine | $86 \pm 8.4$  | Absence d'interaction |
| Thrombine    | $34 \pm 4.8$  | $29 \pm 3.1$          |

**Tableau 4.1** Valeurs de  $K_D$  des interactions entre les aptamères (APT1 et APT2) et les ligands (prothrombine et thrombine), issues de (Kretz 2006). Les valeurs furent déterminées par titrage des aptamères marqués par un fluorophore en solution avec les différents ligands. Lorsqu'aucun changement de fluorescence ne fut détecté, le résultat fut interprété comme une absence d'interaction. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  la variation standard de trois expériences indépendantes.

Cette différence physiologique entre l'exosite I (déjà présent sous forme de proexosite sur la prothrombine) et l'exosite II (absent sur la prothrombine) constitue un avantage intéressant pour notre étude de transformation de la prothrombine sur biopuce, le signal APT1 permettant de vérifier la présence de prothrombine même en absence de thrombine et le signal APT2 étant exclusivement spécifique de la présence de thrombine.

Afin de tester la validité de ce raisonnement, différentes injections courtes des éléments impliqués dans la transformation de la thrombine furent réalisées successivement sur la biopuce. Les signaux obtenus lors de ces différentes injections furent ensuite comparés afin de démontrer la formation de thrombine lors du mélange de la prothrombine avec les autres éléments du complexe prothrombinase (**Figure 4.10**).





**Figure 4.10** Variations de réflectivité (en %) enregistrées par SPRi sur les plots APT1 (**A**) et APT2 (**B**) lors de différentes injections courtes. Les différentes injections considérées sont : thrombine (THR) 50 nM (en noir), prothrombine (proTHR) 50 nM et 100 nM (respectivement en bleu clair et bleu foncé), phospholipides (PL) 6 µM et solution prothrombinase (respectivement en jaune clair et jaune foncé) et enfin proTHR 100 nM dans la solution prothrombinase (en orange). Chaque courbe représente la moyenne des signaux obtenus sur 4 réplicats, corrigés par le signal d'un plot contrôle Zip7.

Sur cette figure, il est aisé de vérifier que les injections de prothrombine seule (50 ou 100 nM) génèrent un signal sur les plots APT1 uniquement, comme déjà observé précédemment. Les injections contrôles de phospholipides (6 µM) et solution prothrombinase (PL 6µM + Facteur Va 0,25 nM + Facteur Xa 0,6 nM) SANS prothrombine ne génèrent aucun signal sur les plots APT2 mais un léger signal linéaire (< 1 % sur la durée de l'injection) sur les plots APT1. Les deux signaux étant confondus, il est raisonnable de supposer que les phospholipides sont à l'origine de ce signal non spécifique sur les plots APT1. Les signaux de l'injection étalon de thrombine 50 nM correspondent à ceux obtenus habituellement sur nos biopuces et traduisent bien une interaction spécifique à la fois sur les plots APT1 et sur les plots APT2.

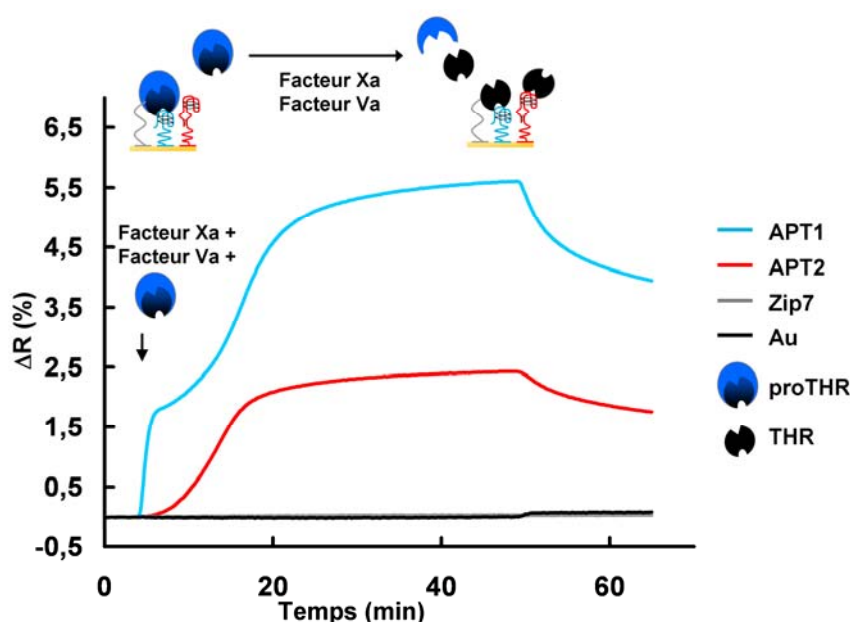
Enfin, l'injection de prothrombine 100 nM dans la solution de prothrombinase permet d'affirmer qu'au moins la moitié de la prothrombine a été efficacement transformée en thrombine avant que le mélange n'arrive sur la biopuce : le signal des plots APT2 correspond à un signal de thrombine, quasiment identique à celui de l'injection de thrombine 50 nM. Celui des plots APT1 est même supérieur à ce dernier.

Cette expérience préliminaire permet ainsi de valider la transformation efficace de la prothrombine en présence des facteurs nécessaires à cette hydrolyse et l'efficacité de notre biopuce pour détecter spécifiquement ce résultat. A présent, les conditions de formation de la thrombine peuvent être explorées plus en détail sur notre biopuce, *via* l'observation et la comparaison de la cinétique des signaux générés en présence ou absence de certains facteurs.



#### 4.2.4 Etude des conditions de formation de la thrombine

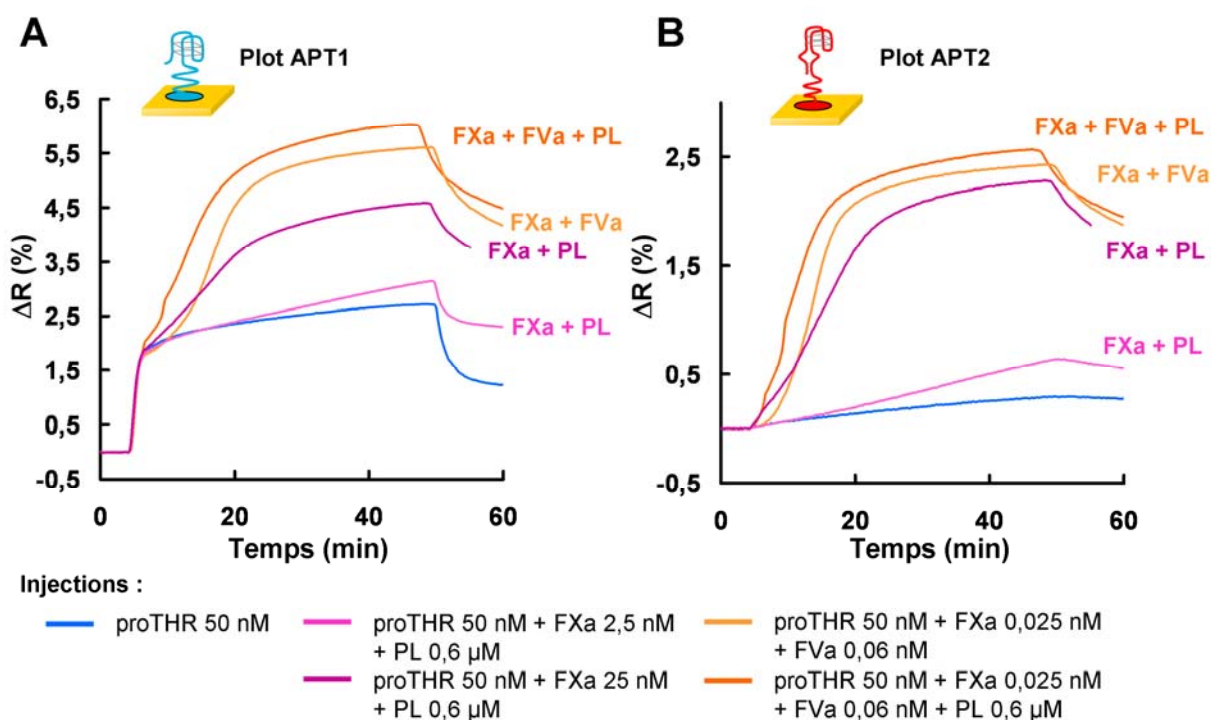
L'expérience précédente (**Figure 4.10**) a permis de constater la présence finale de thrombine dans l'échantillon de prothrombine injecté, lorsque toutes les conditions étaient réunies pour transformer efficacement la prothrombine en thrombine. Cependant, le phénomène en lui-même de transformation n'était pas visible, la prothrombine ayant été probablement consommée durant le laps de temps nécessaire au passage de l'échantillon sur la puce. Afin d'observer le phénomène, différentes concentrations des réactifs furent testées. En particulier, la **Figure 4.11** représente les signaux obtenus lors d'une injection longue de prothrombine 50 nM dans un mélange contenant les facteurs Xa et Va à une concentration 10 fois inférieure à précédemment, sans phospholipide.



**Figure 4.11** Observation en temps réel sur la puce de la formation de thrombine. Chaque courbe correspond à la moyenne des signaux obtenus sur 4 réplicats, corrigés par le signal d'un plot contrôle Zip7, lors d'une injection longue proTHR 50 nM + Facteur Xa 0,025 nM + Facteur Va 0,06 nM.

Cette fois, les signaux indiquent bien que l'échantillon ne contient pas, ou très peu, de thrombine au début de l'injection : le signal des plots APT2 sont nuls (ainsi que la pente à l'origine) et ceux des plots APT1 correspondent au signal rapide et saturable obtenu lors de l'injection de prothrombine 50 nM seule. Très rapidement, ces signaux se mettent pourtant à augmenter, traduisant en temps réel l'activation de la prothrombine par le facteur Xa et son cofacteur, le facteur Va.

Différentes conditions furent ensuite étudiées et comparées via des injections successives de différents mélanges (**Figure 4.12**).



**Figure 4.12** Etude de l'influence de différents éléments sur la formation de thrombine. Variations de réflectivité (en %) enregistrées par SPRi sur les plots APT1 (**A**) et APT2 (**B**) lors de différentes injections longues. Les différentes injections considérées sont : proTHR 50 nM (en bleu), proTHR 50 nM + FXa 2,5 (resp. 25 nM) + PL 0,6 μM (respectivement en rose clair et rose foncé), proTHR 50 nM + FXa 0,025 nM + FVa 0,06 nM (en orange clair) et proTHR 50 nM + FXa 0,025 nM + FVa 0,06 nM + PL 0,6 μM, *i.e.* proTHR 50 nM dans la solution de prothrombinase 0,1X (en orange foncé). Chaque courbe représente la moyenne des signaux obtenus sur 4 réplicats, corrigés par le signal d'un plot contrôle Zip7.

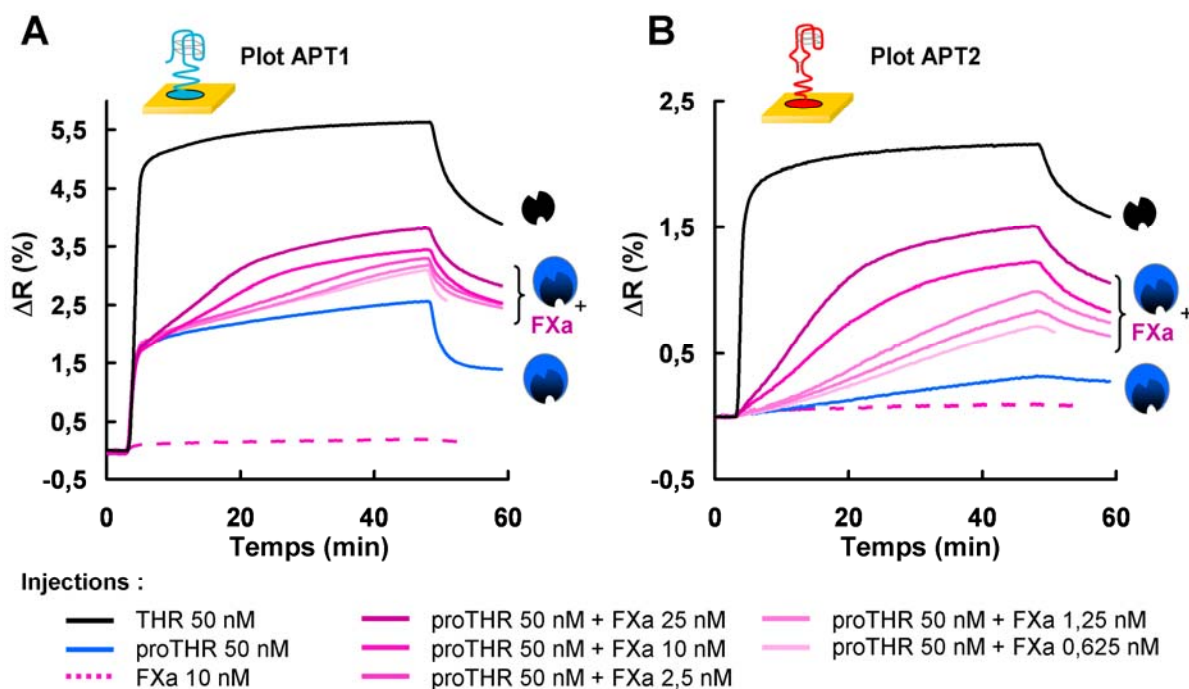
L'injection de prothrombine 50 nM seule (en bleu) sert de référence en illustrant les résultats obtenus lorsqu'aucune molécule de prothrombine n'est transformée en thrombine. Tout signal supérieur à celui-ci traduit donc nécessairement la transformation d'une partie de ces molécules en thrombine.

L'ajout de phospholipides semble améliorer l'efficacité de la réaction (comparaison des injections FXa + FVa + PL et FXa + FVa en orange), même si cet effet n'a pas été très investigué (une seule concentration testée pour un rapport de concentrations en FVa et FXa déjà efficace sans PL).

Par contre, les injections sans cofacteur Va (en rose) permettent immédiatement de vérifier que ce facteur est effectivement à l'origine d'une amplification très importante du phénomène d'activation de la prothrombine. En son absence, le facteur Xa est toujours capable d'hydrolyser la prothrombine mais de façon beaucoup moins efficace : il faut multiplier sa concentration par plus d'un facteur 1000 pour retrouver une efficacité comparable à celle obtenue lorsque FVa est ajouté au mélange en concentration sub-nanomolaire (0,06 nM) (comparaison des injections FXa + PL en rose et FXa + FVa + PL en orange).

## Le facteur Xa

Afin d'approfondir l'étude de l'efficacité du facteur Xa en absence de son cofacteur Va, une gamme plus complète de concentrations fut employée au cours d'une expérience ultérieure (**Figure 4.13**).



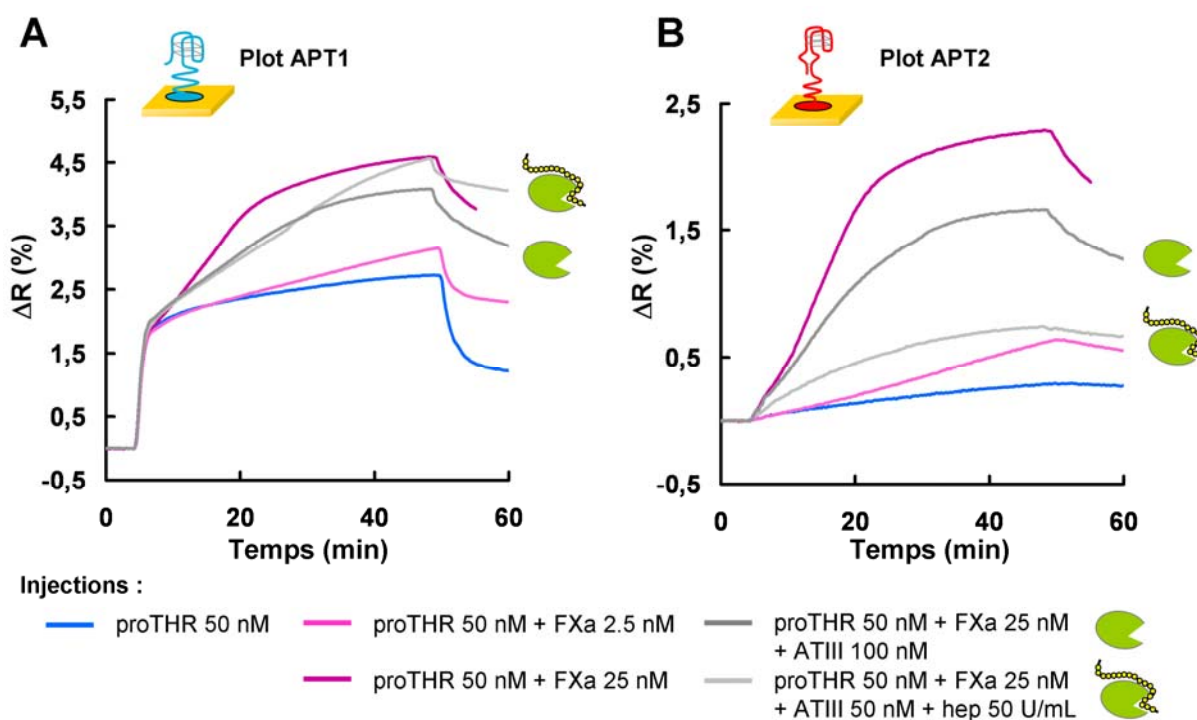
**Figure 4.13** Etude de l'influence de la concentration du facteur Xa (FXa) sur la formation de thrombine. Variations de réflectivité (en %) enregistrées par SPRi sur les plots APT1 (**A**) et APT2 (**B**) lors de différentes injections longues. Les différentes injections considérées sont : THR 50 nM (en noir), proTHR 50 nM + PL 0,6  $\mu$ M (en bleu), FXa 10 nM + PL 0,6  $\mu$ M (en pointillés), proTHR 50 nM + PL 0,6  $\mu$ M + FXa à différentes concentrations : du bas vers le haut 0,625 nM, 1,25 nM, 2,5 nM, 10 nM, 25 nM (en dégradé de rose). Chaque courbe représente la moyenne des signaux obtenus sur 4 répliqués, corrigés par le signal d'un plot contrôle Zip7.

Même s'il est difficile d'analyser quantitativement ce genre de courbes, elles fournissent une représentation de l'efficacité de l'enzyme FXa pour transformer la prothrombine.

Elles peuvent en cela être particulièrement intéressantes à comparer à d'autres profils de courbes obtenus en présence de différents éléments additionnels en solution, en particulier d'inhibiteurs potentiels. Cette hypothèse a rapidement été investiguée dans le cas d'un inhibiteur disponible au laboratoire et utilisé précédemment dans l'étude de l'inhibition de la thrombine : l'antithrombine III (ATIII).

ATIII est en effet l'inhibiteur principal du facteur Xa circulant dans le plasma, même si cet inhibiteur est en réalité capable d'inhiber différentes serine proteases (thrombine, facteur Xa, facteur IXa) (Osterud 1976). Comme dans le cas de la thrombine, cette inhibition est également largement amplifiée en présence d'héparine (Craig 1989).

Au cours de la première série d'injections de prothrombine, l'effet de l'ajout d'ATIII et éventuellement d'héparine fut ainsi évalué (**Figure 4.14**).



**Figure 4.14** Etude de l'influence d'ATIII sur la formation de thrombine. Variations de réflectivité (en %) enregistrées par SPRi sur les plots APT1 (**A**) et APT2 (**B**) lors de différentes injections longues. Les différentes injections considérées sont : proTHR 50 nM (en bleu), proTHR 50 nM + FXa 2,5 nM (resp. 25 nM) + PL 0,6 μM (respectivement en rose clair et rose foncé), proTHR 50 nM + FXa 25 nM + PL 0,6 μM + ATIII 100 nM (en gris foncé) et proTHR 50 nM + FXa 25 nM + PL 0,6 μM + ATIII 100 nM + Hep 50 U.S.P/mL (en gris clair). Chaque courbe représente la moyenne des signaux obtenus sur 4 réplicats, corrigés par le signal d'un plot contrôle Zip7.

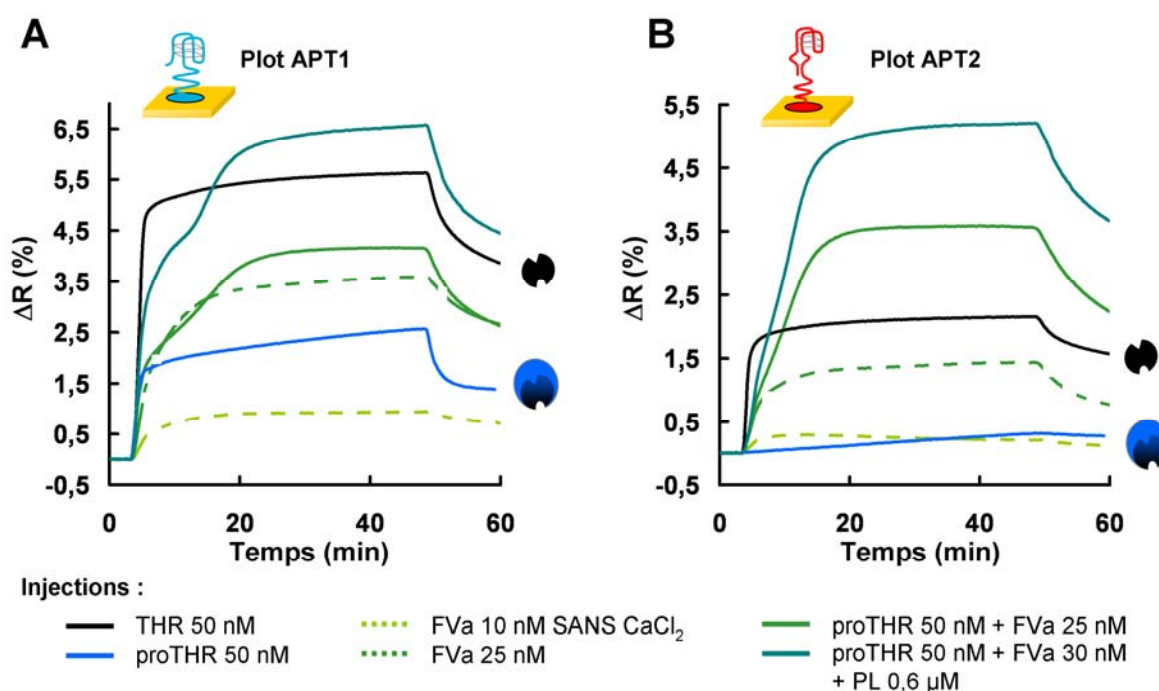
Il est évident que la présence d'ATIII (courbes grises), et plus encore celle d'ATIII et d'héparine, diminuent le signal détecté sur les plots APT2 (et dans une moindre mesure celui des plots APT1). Dans le cas de la co-injection avec l'héparine (en gris clair), la baisse du signal est très importante sur les plots APT2 alors qu'elle l'est beaucoup moins sur les plots APT1, dépassant même le signal obtenu lors de la co-injection avec ATIII seule (sans héparine). Or ce n'est pas forcément surprenant si l'on se rappelle que l'héparine interagit avec la thrombine formée *via* l'exosite II. Nous avons déjà observé ce phénomène dans la partie précédente (**Figure 4.5**, p.108), où nous avons notamment constaté qu'une compétition entre l'héparine et APT2 pour interagir avec l'exosite II de la thrombine tendait à diminuer le signal de thrombine détecté sur les plots APT2, alors que la formation d'un complexe APT1-thrombine-héparine était détectable sur les plots APT1. Ceci peut suffire à justifier les signaux obtenus sur les plots APT1 et APT2 lors de la co-injection de la prothrombine et FXa avec ATIII et l'héparine. Il est donc difficile d'isoler sur ces signaux un phénomène supplémentaire probable d'inhibition de FXa par ATIII.

Le cas de la co-injection avec ATIII (en gris foncé) est ainsi plus intéressant, bien que la baisse du signal enregistrée sur les plots APT2 soit plus faible. En effet dans la partie précédente, l'ajout d'ATIII à cette concentration ne permettait de distinguer aucune différence dans les signaux détectés avec la thrombine seule (à 50 nM). Il est donc plus facile de supposer que cette fois, la baisse de signal des plots APT2 et APT1 est bien due à une

présence plus faible de thrombine formée et donc à l'inhibition effective du facteur Xa par ATIII. Bien sûr d'autres expériences seraient nécessaires pour l'affirmer avec certitude. Cependant cette première expérience permet déjà d'illustrer le principe grâce auquel un effet d'inhibition du facteur Xa peut être détecté et évalué sur nos biopuces. Ces expériences mériteraient en particulier d'être répétées avec des inhibiteurs spécifiques du facteur Xa, tels que les molécules suivantes : le rivaroxaban (Xarelto® ; Bayer Schering Pharma), l'apixaban, le betrixaban ou encore l'edoxaban. Certaines de ces molécules sont en pratique déjà utilisées comme nouveaux médicaments anticoagulants et d'autres sont toujours en cours d'essais cliniques (Laux 2009).

### Le facteur Va

Quelques essais en absence de facteur Xa furent également réalisés afin de vérifier que le facteur Va seul ne permettait pas la transformation de la prothrombine, même à forte concentration. Mais de façon très surprenante, un signal important fut immédiatement détecté ! Ce phénomène fut un peu plus exploré au cours de l'expérience suivante (**Figure 4.15**).



**Figure 4.15** Etude de l'influence de la concentration du facteur Va (FVa) sur la formation de thrombine. Variations de réflectivité (en %) enregistrées par SPRi sur les plots APT1 (**A**) et APT2 (**B**) lors de différentes injections longues. Les différentes injections considérées sont : THR 50 nM (en noir), proTHR 50 nM (en bleu), FVa 25 nM (en vert foncé pointillé), FVa 10 nM dans le tampon de course sans calcium (en vert clair pointillé), proTHR 50 nM + FVa 25 nM (en vert foncé) et proTHR 50 nM + FVa 30 nM + PL 0,6 μM (en vert très foncé). Chaque courbe représente la moyenne des signaux obtenus sur 4 réplicats, corrigés par le signal d'un plot contrôle Zip7.

La première chose à vérifier fut la réponse obtenue lors de l'injection de facteur Va seul (courbes en pointillés), préparé directement à partir d'une dilution du stock commercial de la

protéine purifiée (Cryopec, France). Or FVa 25 nM génère déjà un signal important sur les plots APT1 et APT2 (+ 3.6 % et + 1.4 % respectivement) ! Ceci ne peut vouloir dire que deux choses : soit FVa est effectivement capable d'interagir avec APT1 et APT2, soit l'échantillon n'est pas pur et contient autre chose capable d'interagir avec les aptamères, et donc, probablement de la thrombine. A priori, une affinité entre FVa et les deux aptamères paraît assez peu plausible étant donné que la structure de FVa n'est pas similaire à celle de la thrombine, la cible spécifique des aptamères. Même le facteur Xa et la prothrombine, qui ont une structure bien plus proche de la thrombine, sont incapables de reconnaître les deux aptamères avec une telle intensité. La deuxième hypothèse semble plus probable : l'échantillon commercial de FVa a été préparé en activant le facteur V purifié avec de la thrombine avant d'être à nouveau purifié par chromatographie d'immunoaffinité. D'après le fournisseur, la pureté a finalement été vérifiée par un gel d'électrophorèse SDS-PAGE. Cependant elle n'a pas été révérifiée par nos soins : il est donc possible d'imaginer que celle-ci n'est pas parfaite. Mais il est au moins probable que la proportion de contaminant soit très faible, ce qui n'explique toujours pas l'importance du signal détecté lorsque la concentration de FVa injecté est 25 nM. Le signal ne ressemble pas du tout au signal obtenu lors d'injections de thrombine à faible concentration.

Par contre, il est connu que FVa est encore capable d'interagir avec l'exosite I de la thrombine (Dharmawardana 1998; Dharmawardana 1999). On pourrait donc imaginer que les traces de thrombine présentes en solution sont déjà complexées avec FVa *via* l'exosite I et restent capables d'interagir avec APT2 *via* l'exosite II : la masse du complexe accroché à la surface (thrombine 36 700 Da + FVa 168 000 Da) serait alors à l'origine de l'intensité des signaux détectés sur les plots APT2. Cependant dans ce cas, il reste à expliquer l'intensité encore plus élevée des signaux détectés sur les plots APT1.

De plus, l'ajout de prothrombine lors de co-injections (courbes pleines en vert) permet encore d'augmenter le signal détecté, en faisant plus que doubler le signal des plots APT2. Encore une fois il n'y a à première vue que deux explications possibles : soit de la prothrombine s'ajoute sur les plots, soit de la prothrombine est transformée rapidement en thrombine. Le premier cas ne semble possible que si le facteur Va est finalement bien capable d'interagir avec APT2 directement : l'augmentation de signal observé par rapport à l'injection de FVa seul s'explique alors par la formation de structures « sandwich » APT-FVa-proTHR. Le deuxième cas reste très surprenant en absence totale de facteur Xa.

Les deux explications ne sont ainsi que faiblement satisfaisantes et laissent quelques portes ouvertes à l'exploration de phénomènes inattendus.

## 4.3 Conclusion

A travers ces deux études préliminaires (et non exhaustives) de l'inhibition de la thrombine et de la transformation de la prothrombine, nous avons finalement démontré que les biopuces à aptamères élaborées et mises au point au court de ce travail de thèse constituent un outil exploratoire puissant d'analyse du comportement de la thrombine et de son précurseur, la prothrombine. Nous avons notamment pu observer dans un premier temps



l'interaction de la thrombine avec l'héparine *via* l'exosite II et l'amplification de l'interaction de la thrombine avec l'antithrombine III en présence d'héparine. Dans un deuxième temps, nous avons également enregistré en temps réel la transformation de la prothrombine en thrombine en présence des facteurs nécessaires à cette catalyse, et constaté l'influence de chacun de ces facteurs.

Bien entendu les voies d'exploration ne s'arrêtent pas là. Chacune de ces expériences a ouvert des portes sur de nouvelles possibilités qui mériteraient d'être investiguées : une étude plus approfondie de l'influence des GAGs sur l'activité d'ATIII et HCII, la recherche de l'origine des signaux détectés à « forte » concentration de FVa, l'extraction de données quantitatives de l'efficacité de FXa...

L'un des aspects les plus intéressants de cette dernière étude est la possibilité d'observer en temps réel l'effet inhibiteur de certaines molécules sur la formation de la thrombine. Cette capacité fut éprouvée rapidement au cours de cette étude avec ATIII et l'héparine. Malheureusement pour la lisibilité des signaux, ces molécules sont également responsables de l'inhibition *in vivo* de la thrombine, ce qui rend plus difficile l'analyse des signaux détectés sur la biopuce. C'est pourtant en partie grâce à cette double efficacité que l'héparine est, depuis plusieurs dizaines d'années, l'anticoagulant de choix (avec les anti-vitamine K) pour la prévention et le traitement de la maladie thromboembolique veineuse, dont l'embolie pulmonaire est la complication majeure (Ansell 2008; Hirsh 2008). Bien que ces agents soient efficaces, ils sont associés avec un certain nombre de risques pouvant être fatals. Une alternative émerge depuis quelques années avec la découverte et le développement de nouvelles petites molécules (< 1 kDa) capables de cibler et d'inhiber spécifiquement une enzyme unique de la cascade de coagulation (Laux 2009). Deux de ces agents ont déjà obtenu une autorisation de mise sur le marché : un inhibiteur direct de la thrombine, le dabigatran (Pradaxa® ; Boehringer Ingelheim), et un inhibiteur direct du facteur Xa, le rivaroxaban (Xarelto® ; Bayer Schering Pharma) (Laux 2009). Au contraire de l'héparine, ces nouveaux anticoagulants sont indépendants de l'action d'ATIII. L'action directe et ciblée de ces nouveaux agents pourrait potentiellement augmenter la prédictibilité et l'efficacité des traitements anticoagulants. La théorie du fonctionnement de la cascade de la coagulation et les résultats d'études *in vitro* et d'essais cliniques fournissent de plus quelques arguments semblant montrer que le facteur Xa représente une meilleure cible d'inhibition que la thrombine (Ansell 2007). Ces arguments reposent sur l'effet d'amplification à l'origine du bon fonctionnement de la cascade : inhiber directement le facteur Xa au lieu de la thrombine pourrait prévenir l'apparition du pic de génération de la thrombine observé durant la formation d'un thrombus (ou « caillot ») (Laux 2009). Cela signifie qu'une plus faible concentration d'anticoagulant serait nécessaire pour bloquer la progression du processus de coagulation. Un autre aspect intéressant est, qu'au contraire des inhibiteurs dépendants d'ATIII, les inhibiteurs directs de FXa ont le potentiel d'inhiber le facteur Xa lorsqu'il est libre, mais également dans le complexe prothrombinase ou lié au caillot (Laux 2009). Tous ces arguments justifient l'importance des recherches de nouveaux types d'anticoagulants dirigés contre FXa (ou le complexe prothrombinase) et la pertinence d'un outil capable d'évaluer le

pouvoir inhibiteur de ces molécules de façon simple, rapide, reproductible et sans besoin de réactif supplémentaire. Notre biopuce à aptamères, en étant capable d'enregistrer en temps réel et sans marquage la formation de thrombine après le mélange du ou des facteurs responsables de cette génération, est ainsi une piste encourageante en ce sens. Différents tests sont de plus facilement réalisables sur la même biopuce après une régénération rapide de cette dernière, permettant une comparaison des différentes molécules testées.

Finalement, il reste encore un certain nombre d'interactions de la thrombine qui n'ont pas encore pu être investiguées sur notre biopuce, faute de temps, mais qui représentent sans doute autant de possibilités d'exploration. En particulier, son interaction forte avec la thrombomoduline (une glycoprotéine membranaire), caractérisée par un  $K_D$  de l'ordre du nanomolaire, mériterait d'être rapidement éprouvée, d'autant plus considérant l'importance de cette interaction *in vivo*. Elle permet en effet un basculement du rôle de la thrombine vers sa fonction anticoagulante, la rendant incapable de cliver ses substrats procoagulants et beaucoup plus efficace à activer l'anticoagulante protéine C (Huntington 2005). Evidemment, il serait finalement également intéressant de réaliser des tests enzymatiques de clivage du fibrinogène, en vérifiant si la thrombine capturée sur les plots APT1 et APT2 au cours d'une première injection de thrombine est capable de catalyser la formation de fibrine sur la puce, lors d'une injection ultérieure de fibrinogène (en supposant que les filaments insolubles de fibrine formés restent adsorbés sur la puce).





# 5

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les trois chapitres précédents de ce manuscrit ont permis de décrire en détail chacun des aspects explorés au cours de ce travail de thèse. Les objectifs de ce travail, exposés à la fin du chapitre premier d'introduction générale, se rattachaient au but principal suivant : démontrer la pertinence du couplage de deux outils du domaine des biotechnologies - la SPRi, comme transducteur, et les aptamères, comme éléments de reconnaissance - pour l'analyse de protéines sur biopuces.

L'élaboration de ces biopuces est un processus qui fut maîtrisé et optimisé avec succès au laboratoire, en adoptant une stratégie de greffage localisé par chimie thiol. Cette stratégie, basée sur la formation de couches auto-assemblées mixtes de sondes aptamères et de molécules polyéthylène glycol, a conduit à des performances de détection intéressantes de la protéine modèle étudiée ici : la thrombine. Les biopuces à aptamères ont notamment permis d'obtenir les résultats suivants : une gamme linéaire de quantification de la thrombine non marquée en solution tamponnée de 0,2 à 20 nM et une limite de détection sub-nanomolaire (100 pM), sans nécessité d'étape d'amplification. L'accès aux données cinétiques des interactions a en particulier rendu possible l'exploitation de l'état hors équilibre du système et la réduction du temps de détection à moins de 10 min.

L'utilisation de molécules aptamères ADN comme sondes à la place d'anticorps a grandement simplifié les conditions de fabrication et d'utilisation des biopuces, conservables à sec et réutilisables. Une régénération aisée et rapide (< 10 min également), avec une solution standard de sel (NaCl 1 M) ou d'hydroxyde de sodium (NaOH 50mM), a de plus permis l'enchaînement d'injections de différents échantillons sur les biopuces, pour une comparaison

pertinente et relativement rapide des signaux générés. Ces signaux étant continus et en temps réel grâce à la technique de détection SPRi, ainsi que directement proportionnels à la masse adsorbée à la surface, ils ont fourni des informations cinétiques précieuses sur le profil d'association et de dissociation des molécules étudiées. Enfin le caractère multiplexé de la détection SPRi a permis de détecter et de comparer simultanément et sur le même échantillon la réponse correspondant à différentes interactions sondes-cibles.

Ce sont chaque fois plusieurs, voire tous ces avantages, exploités conjointement, qui ont rendu possibles les différentes études pratiques de ce manuscrit. Avec seulement deux aptamères, APT1 et APT2, dirigés contre la même cible, il fut ainsi possible d'explorer différentes interactions impliquant la thrombine, avec différentes approches.

Premièrement, une étude quantitative de détermination de constante d'association caractérisant l'interaction de la thrombine avec APT2 fut réalisée. L'originalité de l'étude a reposé sur l'utilisation des biopuces et de la détection SPRi pour estimer, de manière indépendante l'une de l'autre, la valeur de cette constante en solution et à la surface de la biopuce. De cette façon, nous avons montré que la valeur déterminée à la surface augmentait lorsque la densité de greffage de l'aptamère diminuait, et s'extrapolait linéairement jusqu'à la valeur déterminée en solution, indiquant clairement un effet coopératif à la surface.

Deuxièmement, nous avons mené une étude approfondie des conditions de formation d'une structure dite « sandwich », correspondant à l'interaction simultanée de la thrombine avec les deux aptamères : l'un étant fixé comme sonde à la surface, l'autre étant injecté en même temps ou ultérieurement à la thrombine. Cette structure particulière, bien que très utile dans la conception de biocapteurs ultrasensibles et spécifiques, déjà largement exploitée dans le cas de la thrombine, n'avait jamais été extensivement étudiée. Le caractère temps réel et multiplexé de nos mesures a notamment permis de mettre en lumière des comportements surprenants et/ou parfois méconnus de la thrombine et ses aptamères. En particulier, la très bonne spécificité d'APT2 pour l'exosite II de la thrombine fut à nouveau mise en évidence, alors que le manque de sélectivité suspecté d'APT1 entre les deux exosites de la thrombine fut confirmé. Nos résultats ont également suggéré un effet allostérique inter-exosite négatif encore jamais observé dans le cas spécifique de l'interaction avec les aptamères APT1 et APT2, même si un tel effet a déjà été décrit, mais également contesté, dans le cas d'interactions de la thrombine avec d'autres molécules. Ces découvertes s'accompagnent évidemment de conséquences directes sur la meilleure stratégie à mettre en œuvre pour détecter efficacement ce sandwich, qui furent explicitées : celle-ci requiert, lorsque c'est possible, la pré-incubation de la thrombine avec l'aptamère secondaire, de préférence APT2, et le facteur d'amplification AVANT l'injection sur le biocapteur où est greffé l'autre aptamère sonde, APT1.

Troisièmement, une approche plus exploratoire de l'étude du comportement de la thrombine et de son précurseur, la prothrombine, en présence d'autres participants de la cascade de la coagulation fut finalement débutée. Celle-ci a déjà rapidement permis d'observer l'interaction de la thrombine avec l'héparine *via* l'exosite II et son influence sur l'amplification de l'inhibition de la thrombine par l'antithrombine III. Surtout, nous avons finalement observé et

---

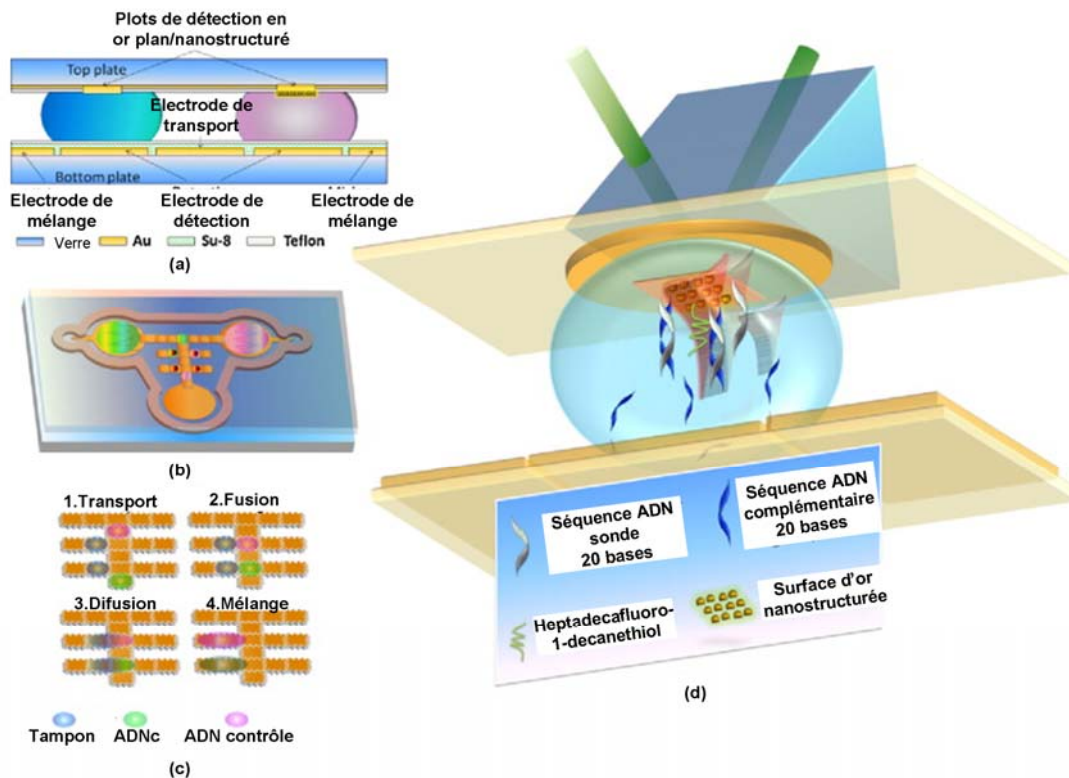
enregistré en temps réel la transformation de la prothrombine en thrombine sur la biopuce en présence du facteur Xa, ainsi que la nette amplification de cette transformation en présence du cofacteur Va et de phospholipides, traduisant la formation du complexe prothrombinase complet. L'accès à la cinétique des interactions assuré par la transduction SPRi offre des possibilités importantes, et d'actualité, de conception de plateformes de criblage d'inhibiteurs de cette transformation, particulièrement utiles pour la recherche de traitements anticoagulants alternatifs plus performants et mieux maîtrisés.

Ces résultats prometteurs ont, à notre sens, largement contribué à accomplir la fonction initialement attribuée à cette étude, en démontrant le potentiel très important de la détection SPRi sur biopuces à aptamères. L'approfondissement et la diversification de ces résultats, qui restent par ailleurs et sur certains aspects des résultats préliminaires, ne sont pas très difficiles à entrevoir. Le développement de plateformes d'études d'interactions entre protéines et ligands dans le domaine de la recherche en Science de la Vie et, de façon plus spécifique, la découverte de nouveaux médicaments, est sûrement la voie la plus excitante à envisager. Ce développement bénéficierait grandement de certaines améliorations envisageables à plus ou moins courts termes sur nos biopuces. Celles-ci peuvent être de différentes natures, et concernent aussi bien l'élément de reconnaissance que l'élément de transduction.

Concernant la SPRi, nous avons déjà établi au cours de cette thèse les nombreux avantages que cette méthode de détection en temps réel, sans marquage et multiplexée, propose. Cependant certaines limitations subsistent et empêchent pour le moment cette technologie de s'imposer plus largement dans certains domaines. En particulier, si la SPRi permet maintenant aisément d'enregistrer simultanément un grand nombre d'interactions entre différents couples ligand-protéine au sein d'un échantillon unique, elle permet difficilement la résolution du problème inverse : l'analyse en parallèle de nombreux échantillons pour un nombre éventuellement plus réduit de ligands. Dans les systèmes traditionnels de SPRi, comme celui qui fut utilisé au cours de cette étude, ce problème est adressé *via* la succession d'injections séquentielles après des étapes de régénération, une solution qui est loin d'être idéale pour des applications d'analyse à haut débit. La découverte de nouveaux médicaments est un bon exemple de ces applications qui nécessiteraient une autre solution. Cependant, ce problème ne vient pas de la technique d'imagerie employée mais plutôt de la méthode de distribution des échantillons et de la fluidique associée. De récents efforts dans ces domaines ont déjà apportés quelques réponses encourageantes et continuent d'œuvrer à la résolution de cette problématique qui représente un vrai enjeu du marché, comme en témoigne la commercialisation de systèmes instrumentaux orientés vers la détection en parallèle de plusieurs échantillons (même si le nombre d'échantillons reste aujourd'hui limité, généralement autour de 5) (Rich 2007). La recherche de systèmes microfluidiques compatibles avec une détection SPRi continue d'avancer et propose des solutions de plus en plus intéressantes grâce, par exemple, au design de puces microfluidiques avec un nombre de cellules de mesure indépendantes de plus en plus important (Eddings 2009; Liu 2009b), ou à l'utilisation alternative de la microfluidique digitale par électromouillage

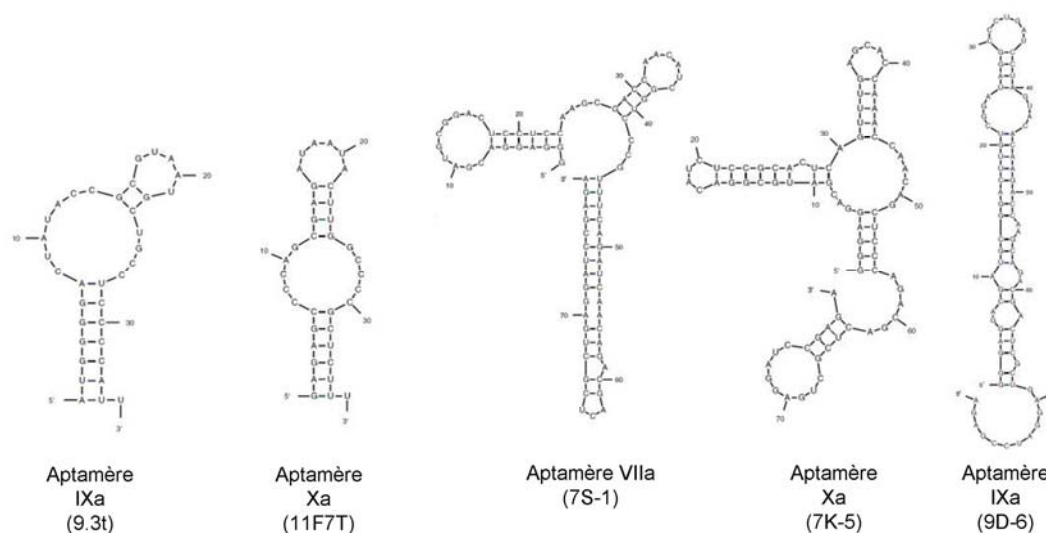
(EWOD) (Malic 2009; 2011). Cette dernière technique permet de manipuler les liquides sous forme de gouttes de très faible volume ( $\sim 100$  nL), en contrôlant leur déplacement *via* la modulation électrique de leur mouillabilité. La microfluidique digitale permet ainsi de réaliser toute sorte d'opérations microfluidiques (déplacement, séparation, mélange) de façon beaucoup plus flexible, en appliquant successivement un potentiel électrique à des électrodes organisées matriciellement. Cette technique a déjà été employée avec succès pour la détection de l'hybridation d'ADN sur une biopuce SPRi pour très faible volume (Malic 2011) (**Figure 5.1**). Conjointement à une nanostructuration des surfaces d'or de détection, elle a ainsi permis de détecter l'hybridation de 500 pM d'ADN (90 attomoles de molécules d'ADN dans une goutte de 180 nL) en moins de 10 minutes, sans amplification, et de mélanger directement sur le lieu de détection différentes solutions. 4 surfaces de détection indépendantes seulement étaient disponibles sur la biopuce utilisée pour cette étude mais les auteurs sont confiants et travaillent actuellement à une implémentation de ce concept pour des puces haute densité.

L'adaptation de nos biopuces à aptamères sur de telles surfaces représenterait un atout de taille. Par exemple, dans le cas particulier de notre étude sur la transformation de la prothrombine par le facteur Xa, elles permettraient de tester en parallèle l'efficacité de différentes molécules sur l'inhibition du facteur Xa. Mais cette technique permettrait également de réaliser le mélange des réactifs directement sur le lieu de détection, nous permettant ainsi d'accéder à la cinétique complète de la catalyse et de l'éventuelle inhibition de la transformation, tout en contrôlant précisément le moment où chaque élément, et l'inhibiteur en particulier, est ajouté au mélange. Dans notre étude actuelle, le mélange est malheureusement toujours réalisé en amont, dans un volume plus important (1 mL) et les échantillons n'arrivent sur le lieu de détection que 3 minutes après la réalisation hors ligne du mélange final, occultant les phénomènes rapides se déroulant durant ces premières minutes.



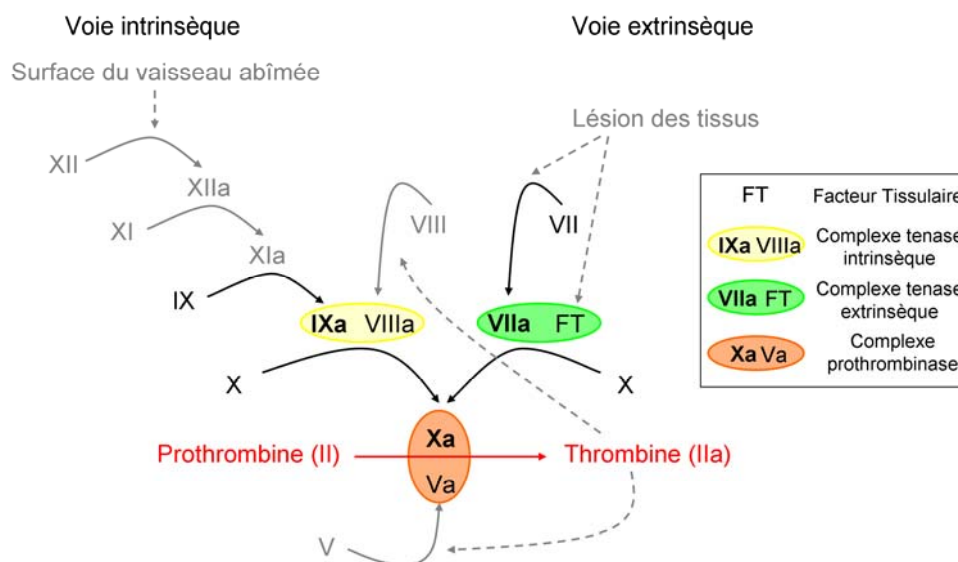
**Figure 5.1** Schéma d'une puce EWOD issu de (Malic 2011). **(a)** Vue d'une section verticale de la puce. **(b)** Design 3D. **(c)** Schéma du protocole de détection réalisé pour détecter l'hybridation d'ADN en utilisant la microfluidique digitale par électromouillage (EWOD). **(d)** Schéma de la puce nanostructurée couplée à la SPRi.

Le développement de nos biopuces pourrait également profiter d'une augmentation et d'une diversification des éléments sondes utilisés. Toutes les études réalisées au cours de cette thèse ont concerné l'emploi de deux aptamères anti-thrombine seulement. Si ces deux aptamères ont suffi à illustrer les possibilités qu'offraient ces molécules pour la détection de protéine, il est sans doute raisonnable de penser que l'utilisation d'un nombre plus important d'aptamères pourrait permettre une analyse encore plus poussée des interactions se déroulant au sein d'un échantillon plus complexe. A titre d'exemple, l'existence d'aptamères dirigés spécifiquement contre chacun des acteurs de la cascade de la coagulation, et leur utilisation simultanée sur une puce unique, représenterait sans aucun doute un outil idéal et plus complet d'exploration de la cascade dans sa globalité. Bien sûr, il faudrait pour cela disposer de tous ces aptamères, mais cela n'est pas irréaliste lorsque l'on sait que certains aptamères ARN ont déjà été sélectionnés contre d'autres facteurs de la coagulation, principalement à des fins thérapeutiques (Nimjee 2005; Oney 2009; Povsic 2010) (**Figure 5.2**).



**Figure 5.2** Séquences et structures secondaires d'aptamères ARN dirigés contre certains facteurs de la coagulation, comme prédites par (Oney 2009).

Une biopuce sur laquelle figurerait ces différents aptamères aux côtés d'APT1 et APT2 pourrait probablement permettre de suivre une séquence d'activation plus complète, avec en particulier celle du facteur X nécessaire à la construction du complexe prothrombinase, lui-même étant également activé au sein d'un complexe tenase où figure le facteur IXa (voie intrinsèque) ou le facteur VIIa (voie extrinsèque) (**Figure 5.3**).



**Figure 5.3** Schéma simplifié du début de la cascade de la coagulation. Les réactions dont l'étude serait envisageable par SPRi avec les aptamères dirigés contre les facteurs IXa, Xa, VIIa et la thrombine sont mises en évidence en noir ; la réaction de transformation de la prothrombine déjà étudiée sur nos biopuces actuelles est indiquée en rouge.

Etudier simultanément ces différentes interactions et en particulier tester l'influence de l'inhibition de différentes cibles par différentes molécules, à différentes étapes de la cascade, sur la même biopuce représenterait sans doute une incroyable opportunité pour cribler et

---

mettre au point des traitements anticoagulants maîtrisés, précis et efficaces. A terme, il est même possible de rêver pouvoir utiliser un jour une telle plateforme comme outil de diagnostic et de mise au point de traitement personnalisé, *via* l'observation des différentes étapes de la coagulation dans des échantillons de plasma directement prélevés sur des patients. Mais d'immenses défis resteraient évidemment à dépasser pour cela, liés à la complexité du milieu que représente du plasma comparé à un milieu tamponné purifié.

Remarquons tout de même que les derniers aptamères cités, dirigés contre les facteurs Xa, IXa et VIIa, sont des aptamères ARN et non ADN, ce qui en fait des sondes beaucoup moins stables et rend leur manipulation plus difficile (nécessité de travailler dans des conditions « RNase-free » *i.e.* exemptes d'enzymes RNase, naturellement responsables de la destruction des molécules d'ARN). La sélection d'aptamères ADN, semblables à APT1 et APT2, serait bien sûr plus souhaitable.

Ce qui nous emmène au dernier point qui me semble important de soulever à la fin de cette thèse. Les avantages des aptamères peuvent sembler écrasants à côté des anticorps traditionnellement utilisés pour la reconnaissance de protéines. Qui ne préférerait pas des molécules avec une sensibilité souvent comparable mais plus petites, moins coûteuses, reproductibles à l'infini, conservables à sec et à température ambiante, conçues et optimisées dès le départ par chimie combinatoire pour cette unique fonction de reconnaissance en lieu et place de protéines issues du système immunitaire animal détournées de leur fonction première et difficilement manipulables ? Présenté comme cela, certainement très peu de personnes. Et pourtant, les aptamères existent maintenant depuis plus de 20 ans, et sont en théorie sélectionnables contre tout type de molécules. Mais pour autant, les anticorps sont bien loin d'avoir disparu des techniques de laboratoire utilisées pour la détection et l'analyse de protéines, bien au contraire. A tel point en fait, que le journal officiel de l'*American Society of Clinical Pathologist* (traduisible par Société Américaine des Biopathologistes<sup>6</sup>) ouvrait son numéro d'octobre 2010 par un éditorial intitulé : « Où sont tous les aptamères ? » (« *Where are all the aptamers ?* ») (Baird 2010). La question est légitime puisque le journal reporte qu'il n'existait toujours pas en 2010 sur le marché américain de test de diagnostic clinique approuvé par la FDA (*Food and Drug Administration*) basé sur l'utilisation d'aptamère. De même, aucun aptamère n'a été approuvé comme médicament par la FDA depuis le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge, Macugen®, en 2004, régulièrement cité en exemple.

L'article propose quelques éléments de réponse à cette question. Premièrement, les aptamères représentent un changement par rapport à l'outil traditionnel éprouvé que sont les anticorps. Or le changement n'est pas toujours le bienvenu dans un laboratoire médical, car il comporte invariablement des risques qui peuvent être difficiles à assumer. Deuxièmement, la formation des pathologistes n'inclue pas toujours un enseignement sur ce que sont les aptamères et leur utilité, ce qui fait que de nombreux praticiens ne sont simplement pas au courant de leur

---

<sup>6</sup> Professionnels de santé responsables de l'analyse des liquides biologiques, de leur prélèvement et de leur interprétation en vue d'identifier l'origine physiopathologique d'une maladie



existence et potentiel. Finalement, une autre raison avancée par l'article est évoquée sous la dénomination « *thrombin problem* » (ou « problème de la thrombine »). L'article explique en effet en quoi les aptamères sont devenus victimes de leur propre succès depuis la sélection des aptamères dirigés contre la thrombine, qui ont focalisé l'attention de nombreux chercheurs : au lieu de mettre au point des tests de détection sur diverses cibles d'intérêt clinique important, beaucoup de laboratoires de recherche se sont attachés à démontrer l'ingéniosité et la faisabilité de nouvelles stratégies de détection de la thrombine avec ces aptamères robustes et bien connus. L'article souligne pourtant par ailleurs que de nombreux aptamères dirigés contre d'autres protéines ont été sélectionnés depuis 1990 et qu'une base de données maintenue par le laboratoire Ellington référence ces publications de sélection (Lee 2004). Mais pour être tout à fait juste envers ces laboratoires travaillant sur les aptamères thrombine, une recherche dans cette base de tous les aptamères ADN publiés depuis 1990 génère à ce jour moins de 100 résultats. Une autre base de données collaborative, très récente, présente des données relatives à la sélection d'environ 1000 aptamères (dont 328 aptamères ADN) mais dirigés contre un peu plus d'une centaine de cibles différentes seulement (dont presque les trois quart tout de même sont des protéines) (Cruz-Toledo 2012). Cela pourrait-il signifier que les cibles potentielles d'aptamères ADN sont en fait limitées, contrairement à ce que laissait espérer le principe d'une sélection combinatoire aussi puissante que la méthode SELEX ? Sûrement pas, car en parallèle de ces publications, des entreprises telles que SomaLogic se sont lancées dans la course à l'étude complète du protéome<sup>7</sup>, prochain défi du monde biomédical, en utilisant des agents de reconnaissance basés sur la technologie aptamère ADN et la technique de sélection SELEX (SomaLogic 2013). En sélectionnant des molécules d'ADN, dont la diversité a été augmentée par l'ajout de nucléotides modifiés chimiquement (Gold 2010), SomaLogic revendique déjà une banque d'agents (appelés SOMAmers<sup>TM</sup>) capables de reconnaître plus de 1100 protéines avec une très haute spécificité et affinité ( $K_D < 1$  nM). Parmi les cibles protéiques, on retrouve notamment les facteurs de la coagulation IX, IXa, V, VII, X, Xa, XI, la thrombine et la prothrombine.

Le potentiel des aptamères est donc bien réel et s'élargit doucement vers des applications plus variées. A titre d'exemples encourageants, si Macugen® reste certes le seul exemple de médicament actuellement disponible sur le marché, 8 autres molécules ont depuis été identifiées et sont à des stades relativement avancées d'études cliniques (Ni 2011). Espérons que les freins précédemment évoqués, auxquels viennent sans aucun doute s'ajouter de nombreuses questions et enjeux de propriété intellectuelle, ne ralentiront pas trop longtemps cet essor.

---

<sup>7</sup> Ensemble des protéines exprimées dans un échantillon biologique à un moment donné, dans des conditions données.

# BIBLIOGRAPHIE

- Adams TE and Huntington JA. Thrombin-cofactor interactions: structural insights into regulatory mechanisms. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 26(8), 1738-45, **2006**.
- Ahmad KM, Oh SS, Kim S, McClellan FM, Xiao Y and Soh HT. Probing the limits of aptamer affinity with a microfluidic SELEX platform. *PLoS One*, 6(11), e27051, **2011**.
- Anderson PJ, Nasset A, Dharmawardana KR and Bock PE. Characterization of proexosite I on prothrombin. *J. Biol. Chem.*, 275(22), 16428-34, **2000**.
- Ansell J. Factor Xa or thrombin: is factor Xa a better target? *J Thromb Haemost*, 5 Suppl 1, 60-4, **2007**.
- Ansell J, Hirsh J, Hylek E, Jacobson A, Crowther M and Palareti G. Pharmacology and management of the vitamin K antagonists: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest*, 133(6 Suppl), 160S-98S, **2008**.
- Baglin TP, Carrell RW, Church FC, Esmon CT and Huntington JA. Crystal structures of native and thrombin-complexed heparin cofactor II reveal a multistep allosteric mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99(17), 11079-84, **2002**.
- Bai L, Yuan R, Chai Y, Yuan Y, Zhuo Y and Mao L. Bi-enzyme functionalized hollow PtCo nanochains as labels for an electrochemical aptasensor. *Biosens. Bioelectron.*, 26(11), 4331-6, **2011**.
- Bai Y, Feng F, Zhao L, Wang C, Wang H, Tian M, Qin J, Duan Y and He X. Aptamer/thrombin/aptamer-AuNPs sandwich enhanced surface plasmon resonance sensor for the detection of subnanomolar thrombin. *Biosens. Bioelectron.*, 47, 265-70, **2013**.
- Baird GS. Where are all the aptamers? *Am. J. Clin. Pathol.*, 134(4), 529-31, **2010**.
- Balamurugan S, Obubuafo A, Soper SA, McCarley RL and Spivak DA. Designing highly specific biosensing surfaces using aptamer monolayers on gold. *Langmuir*, 22(14), 6446-53, **2006**.
- Balamurugan S, Obubuafo A, Soper SA and Spivak DA. Surface immobilization methods for aptamer diagnostic applications. *Anal Bioanal Chem*, 390(4), 1009-21, **2008**.
- Baldrich E, Restrepo A and O'Sullivan CK. Aptasensor development: elucidation of critical parameters for optimal aptamer performance. *Anal. Chem.*, 76(23), 7053-63, **2004**.

- Biacore. "Biacore Sensor Chips." Retrieved 08.07.2013, from <http://www.biacore.com/lifesciences/products/Consumables/guide/index.html>.
- Bichler J, Heit JA and Owen WG. Detection of thrombin in human blood by ex-vivo hirudin. *Thromb. Res.*, 84(4), 289-94, **1996**.
- Bock LC, Griffin LC, Latham JA, Vermaas EH and Toole JJ. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature*, 355(6360), 564-6, **1992**.
- Bock PE. Active-site-selective labeling of blood coagulation proteinases with fluorescence probes by the use of thioester peptide chloromethyl ketones. II. Properties of thrombin derivatives as reporters of prothrombin fragment 2 binding and specificity of the labeling approach for other proteinases. *J. Biol. Chem.*, 267(21), 14974-81, **1992**.
- Bode W, Mayr I, Baumann U, Huber R, Stone SR and Hofsteenge J. The refined 1.9 Å crystal structure of human α-thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment. *EMBO J.*, 8(11), 3467-75, **1989**.
- Carter WJ, Cama E and Huntington JA. Crystal structure of thrombin bound to heparin. *J. Biol. Chem.*, 280(4), 2745-9, **2005**.
- Casu B, Oreste P, Torri G, Zoppetti G, Choay J, Lormeau JC, Petitou M and Sinay P. The structure of heparin oligosaccharide fragments with high anti-(factor Xa) activity containing the minimal antithrombin III-binding sequence. Chemical and <sup>13</sup>C nuclear-magnetic-resonance studies. *Biochem. J.*, 197(3), 599-609, **1981**.
- Centi S, Tombelli S, Minunni M and Mascini M. Aptamer-based detection of plasma proteins by an electrochemical assay coupled to magnetic beads. *Anal. Chem.*, 79(4), 1466-73, **2007**.
- Chang HX, Tang LH, Wang Y, Jiang JH and Li JH. Graphene Fluorescence Resonance Energy Transfer Aptasensor for the Thrombin Detection. *Anal. Chem.*, 82(6), 2341-46, **2010**.
- Chen Q, Tang W, Wang D, Wu X, Li N and Liu F. Amplified QCM-D biosensor for protein based on aptamer-functionalized gold nanoparticles. *Biosensors Bioelectron.*, 26(2), 575-79, **2010**.
- Clark LC, Jr. and Lyons C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 102, 29-45, **1962**.
- Colwell NS, Blinder MA, Tsiang M, Gibbs CS, Bock PE and Tollefsen DM. Allosteric effects of a monoclonal antibody against thrombin exosite II. *Biochemistry (Mosc)*. 37(43), 15057-65, **1998**.
- Craig PA, Olson ST and Shore JD. Transient kinetics of heparin-catalyzed protease inactivation by antithrombin III. Characterization of assembly, product formation, and

- 
- heparin dissociation steps in the factor Xa reaction. *J. Biol. Chem.*, 264(10), 5452-61, **1989**.
- Cruz-Toledo J, McKeague M, Zhang X, Giamberardino A, McConnell E, Francis T, DeRosa MC and Dumontier M. Aptamer Base: a collaborative knowledge base to describe aptamers and SELEX experiments. *Database (Oxford)*, 2012, bas006, **2012**.
- Cryopep. "Cryopep, La cryogénie au service de l'hémostase." Retrieved 19.08.2013, from <http://www.cryopep.fr/schema-poster-de-la-coagulation/>.
- Daniel C, Melaine F, Roupioz Y, Livache T and Buhot A. Real time monitoring of thrombin interactions with its aptamers: insights into the sandwich complex formation. *Biosens. Bioelectron.*, 40(1), 186-92, **2013a**.
- Daniel C, Roupioz Y, Gasparutto D, Livache T and Buhot A. Solution-Phase vs Surface-Phase Aptamer-Protein Affinity from a Label-Free Kinetic Biosensor. *PLoS One*, 8(9), e75419, **2013b**.
- Davie EW and Ratnoff OD. Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. *Science*, 145(3638), 1310-2, **1964**.
- Davie EW. A brief historical review of the waterfall/cascade of blood coagulation. *J. Biol. Chem.*, 278(51), 50819-32, **2003**.
- Dharmawardana KR and Bock PE. Demonstration of exosite I-dependent interactions of thrombin with human factor V and factor Va involving the factor Va heavy chain: analysis by affinity chromatography employing a novel method for active-site-selective immobilization of serine proteinases. *Biochemistry (Mosc)*. 37(38), 13143-52, **1998**.
- Dharmawardana KR, Olson ST and Bock PE. Role of regulatory exosite I in binding of thrombin to human factor V, factor Va, factor Va subunits, and activation fragments. *J. Biol. Chem.*, 274(26), 18635-43, **1999**.
- Ding C, Ge Y and Lin JM. Aptamer based electrochemical assay for the determination of thrombin by using the amplification of the nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.*, 25(6), 1290-4, **2010**.
- Duga S, Asselta R and Tenchini ML. Coagulation factor V. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 36(8), 1393-9, **2004**.
- Eddings MA, Eckman JW, Arana CA, Papalia GA, Connolly JE, Gale BK and Myszka DG. "Spot and hop": internal referencing for surface plasmon resonance imaging using a three-dimensional microfluidic flow cell array. *Anal. Biochem.*, 385(2), 309-13, **2009**.
- Edwards KA, Wang Y and Baeumner AJ. Aptamer sandwich assays: human alpha-thrombin detection using liposome enhancement. *Anal Bioanal Chem*, 398(6), 2645-54, **2010**.

- Ekins R, Chu F and Biggart E. Development of microspot multi-analyte ratiometric immunoassay using dual fluorescent-labelled antibodies. *Anal. Chim. Acta*, 227(0), 73-96, **1989**.
- Ellington AD and Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, 346(6287), 818-22, **1990**.
- Franklin RE and Gosling RG. Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature*, 171(4356), 740-1, **1953**.
- Fredenburgh JC, Stafford AR and Weitz JI. Evidence for allosteric linkage between exosites 1 and 2 of thrombin. *J. Biol. Chem.*, 272(41), 25493-9, **1997**.
- Fuchs J, Dell'Atti D, Buhot A, Calemczuk R, Mascini M and Livache T. Effects of formamide on the thermal stability of DNA duplexes on biochips. *Anal. Biochem.*, 397(1), 132-4, **2010**.
- Fujikawa K, Coan MH, Legaz ME and Davie EW. The mechanism of activation of bovine factor X (Stuart factor) by intrinsic and extrinsic pathways. *Biochemistry (Mosc)*. 13(26), 5290-9, **1974**.
- Gershon D. Microarray technology: an array of opportunities. *Nature*, 416(6883), 885-91, **2002**.
- Gold L, Ayers D, Bertino J, Bock C, Bock A, Brody EN, Carter J, Dalby AB, Eaton BE, Fitzwater T, *et al.* Aptamer-based multiplexed proteomic technology for biomarker discovery. *PLoS One*, 5(12), e15004, **2010**.
- Gronewold TM, Glass S, Quandt E and Famulok M. Monitoring complex formation in the blood-coagulation cascade using aptamer-coated SAW sensors. *Biosens. Bioelectron.*, 20(10), 2044-52, **2005**.
- Grosjean L, Cherif B, Mercey E, Roget A, Levy Y, Marche PN, Villiers MB and Livache T. A polypyrrole protein microarray for antibody-antigen interaction studies using a label-free detection process. *Anal. Biochem.*, 347(2), 193-200, **2005**.
- Guedon P, Livache T, Martin F, Lesbre F, Roget A, Bidan G and Levy Y. Characterization and optimization of a real-time, parallel, label-free, polypyrrole-based DNA sensor by surface plasmon resonance imaging. *Anal. Chem.*, 72(24), 6003-9, **2000**.
- Guinto ER and Esmon CT. Loss of prothrombin and of factor Xa-factor Va interactions upon inactivation of factor Va by activated protein C. *J. Biol. Chem.*, 259(22), 13986-92, **1984**.
- Guo L, Ferhan AR, Lee K and Kim DH. Nanoarray-based biomolecular detection using individual Au nanoparticles with minimized localized surface plasmon resonance variations. *Anal. Chem.*, 83(7), 2605-12, **2011**.

- 
- Hardin CC, Perry AG and White K. Thermodynamic and kinetic characterization of the dissociation and assembly of quadruplex nucleic acids. *Biopolymers*, 56(3), 147-94, **2000**.
- Hirsh J, Bauer KA, Donati MB, Gould M, Samama MM and Weitz JI. Parenteral anticoagulants: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest*, 133(6 Suppl), 141S-59S, **2008**.
- Hogg PJ, Jackson CM, Labanowski JK and Bock PE. Binding of fibrin monomer and heparin to thrombin in a ternary complex alters the environment of the thrombin catalytic site, reduces affinity for hirudin, and inhibits cleavage of fibrinogen. *J. Biol. Chem.*, 271(42), 26088-95, **1996**.
- Homola J. Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species. *Chem. Rev.*, 108(2), 462-93, **2008**.
- Horiba-Scientific. "Multiplex label-free interaction analysis." Retrieved 08.07.2013, from <http://www.horiba.com/scientific/products/surface-plasmon-resonance-imaging-spri/spri-platform/>.
- Huang DW, Niu CG, Qin PZ, Ruan M and Zeng GM. Time-resolved fluorescence aptamer-based sandwich assay for thrombin detection. *Talanta*, 83(1), 185-9, **2010**.
- Huang H and Zhu JJ. DNA aptamer-based QDs electrochemiluminescence biosensor for the detection of thrombin. *Biosens. Bioelectron.*, 25(4), 927-30, **2009**.
- Huntington JA, Read RJ and Carrell RW. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature*, 407(6806), 923-6, **2000**.
- Huntington JA. Molecular recognition mechanisms of thrombin. *J Thromb Haemost*, 3(8), 1861-72, **2005**.
- Ikebukuro K, Kiyohara C and Sode K. Novel electrochemical sensor system for protein using the aptamers in sandwich manner. *Biosens. Bioelectron.*, 20(10), 2168-72, **2005**.
- Iliuk AB, Hu L and Tao WA. Aptamer in bioanalytical applications. *Anal. Chem.*, 83(12), 4440-52, **2011**.
- Jackman MP, Parry MA, Hofsteenge J and Stone SR. Intrinsic fluorescence changes and rapid kinetics of the reaction of thrombin with hirudin. *J. Biol. Chem.*, 267(22), 15375-83, **1992**.
- Jalit Y, Gutierrez FA, Dubacheva G, Goyer C, Coche-Guerente L, Defrancq E, Labbe P, Rivas GA and Rodriguez MC. Characterization of a modified gold platform for the development of a label-free anti-thrombin aptasensor. *Biosens. Bioelectron.*, 41, 424-9, **2013**.
- Jordan CE, Frutos AG, Thiel AJ and Corn RM. Surface plasmon resonance imaging measurements of DNA hybridization adsorption and streptavidin/DNA multilayer formation at chemically modified gold surfaces. *Anal. Chem.*, 69(24), 4939-47, **1997**.

- Jung A, Gronewold TMA, Tewes M, Quandt E and Berlin P. Biofunctional structural design of SAW sensor chip surfaces in a microfluidic sensor system. *Sensors Actuators B: Chem.*, 124(1), 46-52, **2007**.
- Kalafatis M, Xue J, Lawler CM and Mann KG. Contribution of the heavy and light chains of factor Va to the interaction with factor Xa. *Biochemistry (Mosc)*. 33(21), 6538-45, **1994**.
- Kankia BI and Marky LA. Folding of the thrombin aptamer into a G-quadruplex with Sr(2+): stability, heat, and hydration. *J. Am. Chem. Soc.*, 123(44), 10799-804, **2001**.
- Kim DK, Kerman K, Hiep HM, Saito M, Yamamura S, Takamura Y, Kwon YS and Tamiya E. Label-free optical detection of aptamer-protein interactions using gold-capped oxide nanostructures. *Anal. Biochem.*, 379(1), 1-7, **2008**.
- Kodoyianni V. Label-free analysis of biomolecular interactions using SPR imaging. *BioTechniques*, 50(1), 32-40, **2011**.
- Kretschmann E and Raether H. Radiative Decay of Non Radiative Surface Plasmons Excited by Light. *Zeitschrift Fur Naturforschung Part a-Astrophysik Physik Und Physikalische Chemie*, A 23(12), 2135-&, **1968**.
- Kretz CA, Stafford AR, Fredenburgh JC and Weitz JI. HD1, a thrombin-directed aptamer, binds exosite 1 on prothrombin with high affinity and inhibits its activation by prothrombinase. *J. Biol. Chem.*, 281(49), 37477-85, **2006**.
- Kwon MJ, Lee J, Wark AW and Lee HJ. Nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance detection of proteins at attomolar concentrations: comparing different nanoparticle shapes and sizes. *Anal. Chem.*, 84(3), 1702-7, **2012**.
- Lane DA, Philippou H and Huntington JA. Directing thrombin. *Blood*, 106(8), 2605-12, **2005**.
- Laux V, Perzborn E, Heitmeier S, von Degenfeld G, Dittrich-Wengenroth E, Buchmuller A, Gerdes C and Misselwitz F. Direct inhibitors of coagulation proteins - the end of the heparin and low-molecular-weight heparin era for anticoagulant therapy? *Thromb. Haemost.*, 102(5), 892-9, **2009**.
- Lee CJ and Ansell JE. Direct thrombin inhibitors. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 72(4), 581-92, **2011**.
- Lee JF, Hesselberth JR, Meyers LA and Ellington AD. Aptamer database. *Nucleic Acids Res*, 32(Database issue), D95-100, **2004**.
- Levicky R and Horgan A. Physicochemical perspectives on DNA microarray and biosensor technologies. *Trends Biotechnol.*, 23(3), 143-9, **2005**.
- Lewin B. Genes IV. USA, Oxford University Press. **1990**

- 
- Li B, Wang Y, Wei H and Dong S. Amplified electrochemical aptasensor taking AuNPs based sandwich sensing platform as a model. *Biosens. Bioelectron.*, 23(7), 965-70, **2008**.
- Li F, Zhang J, Cao X, Wang L, Li D, Song S, Ye B and Fan C. Adenosine detection by using gold nanoparticles and designed aptamer sequences. *Analyst*, 134(7), 1355-60, **2009**.
- Li W, Johnson DJ, Esmon CT and Huntington JA. Structure of the antithrombin-thrombin-heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin. *Nat Struct Mol Biol*, 11(9), 857-62, **2004**.
- Li Y, Guo L, Zhang F, Zhang Z, Tang J and Xie J. High-sensitive determination of human alpha-thrombin by its 29-mer aptamer in affinity probe capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 29(12), 2570-7, **2008**.
- Liang G, Cai S, Zhang P, Peng Y, Chen H, Zhang S and Kong J. Magnetic relaxation switch and colorimetric detection of thrombin using aptamer-functionalized gold-coated iron oxide nanoparticles. *Anal. Chim. Acta*, 689(2), 243-49, **2011**.
- Liaw PC, Fredenburgh JC, Stafford AR, Tulinsky A, Austin RC and Weitz JI. Localization of the thrombin-binding domain on prothrombin fragment 2. *J. Biol. Chem.*, 273(15), 8932-9, **1998**.
- Lin PH, Chen RH, Lee CH, Chang Y, Chen CS and Chen WY. Studies of the binding mechanism between aptamers and thrombin by circular dichroism, surface plasmon resonance and isothermal titration calorimetry. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 88(2), 552-8, **2011**.
- Lindahl U, Thunberg L, Backstrom G and Riesenfeld J. The antithrombin-binding sequence of heparin. *Biochem. Soc. Trans.*, 9(6), 499-51, **1981**.
- Liu J, Cao Z and Lu Y. Functional nucleic acid sensors. *Chem. Rev.*, 109(5), 1948-98, **2009a**.
- Liu J, Eddings MA, Miles AR, Bukasov R, Gale BK and Shumaker-Parry JS. In situ microarray fabrication and analysis using a microfluidic flow cell array integrated with surface plasmon resonance microscopy. *Anal. Chem.*, 81(11), 4296-301, **2009b**.
- Liu LW, Ye J, Johnson AE and Esmon CT. Proteolytic formation of either of the two prothrombin activation intermediates results in formation of a hirugen-binding site. *J. Biol. Chem.*, 266(35), 23633-6, **1991**.
- Liu LW, Rezaie AR, Carson CW, Esmon NL and Esmon CT. Occupancy of anion binding exosite 2 on thrombin determines Ca<sup>2+</sup> dependence of protein C activation. *J. Biol. Chem.*, 269(16), 11807-12, **1994**.
- Liu Y, Tuleouva N, Ramanculov E and Revzin A. Aptamer-based electrochemical biosensor for interferon gamma detection. *Anal. Chem.*, 82(19), 8131-6, **2010**.



- Livache T, Roget A, Dejean E, Barthet C, Bidan G and Teoule R. Preparation of a DNA matrix via an electrochemically directed copolymerization of pyrrole and oligonucleotides bearing a pyrrole group. *Nucleic Acids Res*, 22(15), 2915-21, **1994**.
- Love JC, Estroff LA, Kriebel JK, Nuzzo RG and Whitesides GM. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chem. Rev.*, 105(4), 1103-69, **2005**.
- Luzi E, Minunni M, Tombelli S and Mascini M. New trends in affinity sensing: aptamers for ligand binding. *Trac-Trends Anal. Chem.*, 22(11), 810-18, **2003**.
- Maaroufi RM, Jozefowicz M, Tapon-Brethaudiere J and Fischer AM. Mechanism of thrombin inhibition by antithrombin and heparin cofactor II in the presence of heparin. *Biomaterials*, 18(3), 203-11, **1997**.
- Macaya RF, Schultze P, Smith FW, Roe JA and Feigon J. Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90(8), 3745-9, **1993**.
- Macaya RF, Waldron JA, Beutel BA, Gao H, Joesten ME, Yang M, Patel R, Bertelsen AH and Cook AF. Structural and functional characterization of potent antithrombotic oligonucleotides possessing both quadruplex and duplex motifs. *Biochemistry (Mosc)*. 34(13), 4478-92, **1995**.
- Macfarlane RG. An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and Its Function as a Biochemical Amplifier. *Nature*, 202, 498-9, **1964**.
- Macugen. "Macugen, an exciting treatment for AMD." Retrieved 06.09.2010, from [www.macugen.com](http://www.macugen.com).
- Maillard E (2004). Développement d'un système optique d'imagerie en résonance de plasmons de surface pour l'analyse simultanée de multiples interactions biomoléculaires en temps réel. Paris, Paris-Sud XI Orsay: 288.
- Malic L, Veres T and Tabrizian M. Two-dimensional droplet-based surface plasmon resonance imaging using electrowetting-on-dielectric microfluidics. *Lab Chip*, 9(3), 473-5, **2009**.
- Malic L, Veres T and Tabrizian M. Nanostructured digital microfluidics for enhanced surface plasmon resonance imaging. *Biosens. Bioelectron.*, 26(5), 2053-9, **2011**.
- Mani RJ, Dye RG, Snider TA, Wang S and Clinkenbeard KD. Bi-cell surface plasmon resonance detection of aptamer mediated thrombin capture in serum. *Biosens. Bioelectron.*, 26(12), 4832-6, **2011**.
- Mann KG. Prothrombin. *Methods Enzymol.*, 45, 123-56, **1976**.
- Mann KG, Butenas S and Brummel K. The dynamics of thrombin formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 23(1), 17-25, **2003**.

- 
- Mariani S, Ermini M, Scarano S, Bellissima F, Bonini M, Berti D and Minunni M. Improving surface plasmon resonance imaging of DNA by creating new gold and silver based surface nanostructures. *Microchimica Acta*, 180(11-12), 1093-99, **2013**.
- Martino L, Virno A, Randazzo A, Virgilio A, Esposito V, Giancola C, Bucci M, Cirino G and Mayol L. A new modified thrombin binding aptamer containing a 5'-5' inversion of polarity site. *Nucleic Acids Res*, 34(22), 6653-62, **2006**.
- Meini N, Farre C, Chaix C, Kherrat R, Dzyadevych S and Jaffrezic-Renault N. A sensitive and selective thrombin impedimetric aptasensor based on tailored aptamers obtained by solid-phase synthesis. *Sensors Actuators B: Chem.*, 166â€“167(0), 715-20, **2012**.
- Milgram S, Bombera R, Livache T and Roupioz Y. Antibody microarrays for label-free cell-based applications. *Methods*, 56(2), 326-33, **2012**.
- Muller J, Wulffen B, Potzsch B and Mayer G. Multidomain targeting generates a high-affinity thrombin-inhibiting bivalent aptamer. *ChemBioChem*, 8(18), 2223-6, **2007**.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G and Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 51 Pt 1, 263-73, **1986**.
- Murano G, Williams L, Miller-Andersson M, Aronson DL and King C. Some properties of antithrombin-III and its concentration in human plasma. *Thromb. Res.*, 18(1-2), 259-62, **1980**.
- Myrmel KH, Lundblad RL and Mann KG. Characteristics of the association between prothrombin fragment 2 and alpha-thrombin. *Biochemistry (Mosc)*. 15(8), 1767-73, **1976**.
- Nagel B, Dellweg H and Gierasch LM. Glossary for Chemists of Terms Used in Biotechnology - (Iupac Recommendations 1992). *Pure Appl. Chem.*, 64(1), 143-68, **1992**.
- Ni X, Castanares M, Mukherjee A and Lupold SE. Nucleic acid aptamers: clinical applications and promising new horizons. *Curr. Med. Chem.*, 18(27), 4206-14, **2011**.
- Nieba L, Krebber A and Pluckthun A. Competition BIAcore for measuring true affinities: large differences from values determined from binding kinetics. *Anal. Biochem.*, 234(2), 155-65, **1996**.
- Nimjee SM, Rusconi CP, Harrington RA and Sullenger BA. The potential of aptamers as anticoagulants. *Trends Cardiovasc. Med.*, 15(1), 41-5, **2005**.
- O'Keeffe D, Olson ST, Gasiunas N, Gallagher J, Baglin TP and Huntington JA. The heparin binding properties of heparin cofactor II suggest an antithrombin-like activation mechanism. *J. Biol. Chem.*, 279(48), 50267-73, **2004**.

- O'Shannessy DJ and Winzor DJ. Interpretation of deviations from pseudo-first-order kinetic behavior in the characterization of ligand binding by biosensor technology. *Anal. Biochem.*, 236(2), 275-83, **1996**.
- Olmsted IR, Xiao Y, Cho M, Csordas AT, Sheehan JH, Meiler J, Soh HT and Bornhop DJ. Measurement of aptamer-protein interactions with back-scattering interferometry. *Anal. Chem.*, 83(23), 8867-70, **2011**.
- Olson ST and Shore JD. Demonstration of a two-step reaction mechanism for inhibition of alpha-thrombin by antithrombin III and identification of the step affected by heparin. *J. Biol. Chem.*, 257(24), 14891-5, **1982**.
- Olson ST. Transient kinetics of heparin-catalyzed protease inactivation by antithrombin III. Linkage of protease-inhibitor-heparin interactions in the reaction with thrombin. *J. Biol. Chem.*, 263(4), 1698-708, **1988**.
- Olson ST and Bjork I. Predominant contribution of surface approximation to the mechanism of heparin acceleration of the antithrombin-thrombin reaction. Elucidation from salt concentration effects. *J. Biol. Chem.*, 266(10), 6353-64, **1991a**.
- Olson ST, Halvorson HR and Bjork I. Quantitative characterization of the thrombin-heparin interaction. Discrimination between specific and nonspecific binding models. *J. Biol. Chem.*, 266(10), 6342-52, **1991b**.
- Olson ST, Bjork I, Sheffer R, Craig PA, Shore JD and Choay J. Role of the antithrombin-binding pentasaccharide in heparin acceleration of antithrombin-proteinase reactions. Resolution of the antithrombin conformational change contribution to heparin rate enhancement. *J. Biol. Chem.*, 267(18), 12528-38, **1992**.
- Oney S, Lam RT, Bompiani KM, Blake CM, Quick G, Heidel JD, Liu JY, Mack BC, Davis ME, Leong KW, *et al.* Development of universal antidotes to control aptamer activity. *Nat. Med.*, 15(10), 1224-8, **2009**.
- Ostatna V, Vaisocherova H, Homola J and Hianik T. Effect of the immobilisation of DNA aptamers on the detection of thrombin by means of surface plasmon resonance. *Anal Bioanal Chem*, 391(5), 1861-9, **2008**.
- Osterud B, Miller-Andersson M, Abildgaard U and Prydz H. The effect of antithrombin III on the activity of the coagulation factors VII, IX and X. *Thromb. Haemost.*, 35(2), 295-304, **1976**.
- Otto A. Excitation of Nonradiative Surface Plasma Waves in Silver by Method of Frustrated Total Reflection. *Zeitschrift Fur Physik*, 216(4), 398-&, **1968**.
- Ouyang X, Yu R, Jin J, Li J, Yang R, Tan W and Yuan J. New strategy for label-free and time-resolved luminescent assay of protein: conjugate Eu<sup>3+</sup> complex and aptamer-wrapped carbon nanotubes. *Anal. Chem.*, 83(3), 782-9, **2010**.
- Paborsky LR, McCurdy SN, Griffin LC, Toole JJ and Leung LL. The single-stranded DNA aptamer-binding site of human thrombin. *J. Biol. Chem.*, 268(28), 20808-11, **1993**.

- 
- Padmanabhan K, Padmanabhan KP, Ferrara JD, Sadler JE and Tulinsky A. The structure of alpha-thrombin inhibited by a 15-mer single-stranded DNA aptamer. *J. Biol. Chem.*, 268(24), 17651-4, **1993**.
- Pagano B, Martino L, Randazzo A and Giancola C. Stability and binding properties of a modified thrombin binding aptamer. *Biophys. J.*, 94(2), 562-9, **2008**.
- Palchetti I and Mascini M. Electrochemical nanomaterial-based nucleic acid aptasensors. *Anal Bioanal Chem*, 402(10), 3103-14, **2012**.
- Park MH, Duan X, Ofir Y, Creran B, Patra D, Ling XY, Huskens J and Rotello VM. Chemically directed immobilization of nanoparticles onto gold substrates for orthogonal assembly using dithiocarbamate bond formation. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2(3), 795-9, **2010**.
- Polonschii C, David S, Tombelli S, Mascini M and Gheorghiu M. A novel low-cost and easy to develop functionalization platform. Case study: aptamer-based detection of thrombin by surface plasmon resonance. *Talanta*, 80(5), 2157-64, **2010**.
- Povsic TJ, Sullenger BA, Zelenkofske SL, Rusconi CP and Becker RC. Translating nucleic acid aptamers to antithrombotic drugs in cardiovascular medicine. *J Cardiovasc Transl Res*, 3(6), 704-16, **2010**.
- Prandoni P, Dalla Valle F, Piovello C, Tormene D and Pesavento R. New anticoagulants for the treatment of venous thromboembolism. *Minerva Med.*, 104(2), 131-39, **2013**.
- Ramberg PJ. The death of vitalism and the birth of organic chemistry: Wohler's urea synthesis and the disciplinary identity of organic chemistry. *Ambix*, 47(3), 170-95, **2000**.
- Rao AN, Rodesch CK and Grainger DW. Real-time fluorescent image analysis of DNA spot hybridization kinetics to assess microarray spot heterogeneity. *Anal. Chem.*, 84(21), 9379-87, **2012**.
- Rezaie AR and Yang L. Thrombomodulin allosterically modulates the activity of the anticoagulant thrombin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100(21), 12051-6, **2003**.
- Rich RL and Myszkowski DG. Higher-throughput, label-free, real-time molecular interaction analysis. *Anal. Biochem.*, 361(1), 1-6, **2007**.
- Rinker S, Ke Y, Liu Y, Chhabra R and Yan H. Self-assembled DNA nanostructures for distance-dependent multivalent ligand-protein binding. *Nat Nanotechnol*, 3(7), 418-22, **2008**.
- Rosenberg RD. Heparin, antithrombin, and abnormal clotting. *Annu. Rev. Med.*, 29, 367-78, **1978**.
- Russo Krauss I, Merlino A, Giancola C, Randazzo A, Mazzarella L and Sica F. Thrombin-aptamer recognition: a revealed ambiguity. *Nucleic Acids Res*, 39(17), 7858-67, **2011**.

- Sassolas A, Blum LJ and Leca-Bouvier BD. Optical detection systems using immobilized aptamers. *Biosens. Bioelectron.*, **2011**.
- Scarano S, Mascini M, Turner APF and Minunni M. Surface plasmon resonance imaging for affinity-based biosensors. *Biosens. Bioelectron.*, 25(5), 957-66, **2010**.
- Seefeld TH, Zhou WJ and Corn RM. Rapid microarray detection of DNA and proteins in microliter volumes with surface plasmon resonance imaging measurements. *Langmuir*, 27(10), 6534-40, **2011**.
- Sheehan JP and Sadler JE. Molecular mapping of the heparin-binding exosite of thrombin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91(12), 5518-22, **1994**.
- Shevchenko Y, Francis TJ, Blair DA, Walsh R, DeRosa MC and Albert J. In situ biosensing with a surface plasmon resonance fiber grating aptasensor. *Anal. Chem.*, 83(18), 7027-34, **2011**.
- Shim JW, Tan Q and Gu LQ. Single-molecule detection of folding and unfolding of the G-quadruplex aptamer in a nanopore nanocavity. *Nucleic Acids Res*, 37(3), 972-82, **2009**.
- Shuman MA and Majerus PW. The measurement of thrombin in clotting blood by radioimmunoassay. *J. Clin. Invest.*, 58(5), 1249-58, **1976**.
- Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PG, Irving JA, Lomas DA, Luke CJ, Moyer RW, *et al.* The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J. Biol. Chem.*, 276(36), 33293-6, **2001**.
- Skelley AM, Scherer JR, Aubrey AD, Grover WH, Ivester RH, Ehrenfreund P, Grunthaner FJ, Bada JL and Mathies RA. Development and evaluation of a microdevice for amino acid biomarker detection and analysis on Mars. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102(4), 1041-6, **2005**.
- SomaLogic. "SomaLogic, Unlocking protein biomarkers to transform healthcare." Retrieved 08.08.2013, from <http://www.somallogic.com/>.
- Sosic A, Meneghello A, Cretaio E and Gatto B. Human thrombin detection through a sandwich aptamer microarray: interaction analysis in solution and in solid phase. *Sensors (Basel)*, 11(10), 9426-41, **2011**.
- Spoto G and Minunni M. Surface Plasmon Resonance Imaging: What Next? *Journal of Physical Chemistry Letters*, 3(18), 2682-91, **2012**.
- Steel AB, Levicky RL, Herne TM and Tarlov MJ. Immobilization of nucleic acids at solid surfaces: effect of oligonucleotide length on layer assembly. *Biophys. J.*, 79(2), 975-81, **2000**.
- Stief TW. Specific determination of plasmatic thrombin activity. *Clin Appl Thromb Hemost*, 12(3), 324-9, **2006**.

- 
- Suraniti E, Sollier E, Calemczuk R, Livache T, Marche PN, Villiers MB and Roupioz Y. Real-time detection of lymphocytes binding on an antibody chip using SPR imaging. *Lab on a Chip*, 7(9), 1206-08, **2007**.
- Tang J, Tang D, Niessner R, Knopp D and Chen G. Hierarchical dendritic gold microstructure-based aptasensor for ultrasensitive electrochemical detection of thrombin using functionalized mesoporous silica nanospheres as signal tags. *Anal. Chim. Acta*, 720(0), 1-8, **2012**.
- Tang Q, Su X and Loh KP. Surface plasmon resonance spectroscopy study of interfacial binding of thrombin to antithrombin DNA aptamers. *J. Colloid Interface Sci.*, 315(1), 99-106, **2007**.
- Tasset DM, Kubik MF and Steiner W. Oligonucleotide inhibitors of human thrombin that bind distinct epitopes. *J. Mol. Biol.*, 272(5), 688-98, **1997**.
- Tennico YH, Hutanu D, Koesdjojo MT, Bartel CM and Remcho VT. On-chip aptamer-based sandwich assay for thrombin detection employing magnetic beads and quantum dots. *Anal. Chem.*, 82(13), 5591-7, **2010**.
- Tiselius A. A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. *Transactions of the Faraday Society*, 33(0), 524-31, **1937**.
- Tollefsen DM, Majerus DW and Blank MK. Heparin cofactor II. Purification and properties of a heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma. *J. Biol. Chem.*, 257(5), 2162-9, **1982**.
- Tombelli S, Minunni M and Mascini M. Analytical applications of aptamers. *Biosens. Bioelectron.*, 20(12), 2424-34, **2005**.
- Tombelli S, Minunni M and Mascini M. Aptamers-based assays for diagnostics, environmental and food analysis. *Biomol Eng*, 24(2), 191-200, **2007**.
- Toulme J-J, Da Rocha S, Dausse E, Azema L, Lebars I and Moreau S. Les aptamères : du concept a l'outil. *Médecine Nucléaire*, 31(9), 478-84, **2007**.
- Tswett M. Adsorption analysis and chromatographic method. Application on the chemistry of the Chlorophylls. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 24, 384-93, **1906**.
- Tuerk C and Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 249(4968), 505-10, **1990**.
- Tuleuova N and Revzin A. Micropatterning of Aptamer Beacons to Create Cytokine-Sensing Surfaces. *Cell Mol Bioeng*, 3(4), 337-44, **2010**.
- Verhamme IM, Olson ST, Tollefsen DM and Bock PE. Binding of exosite ligands to human thrombin. Re-evaluation of allosteric linkage between thrombin exosites I and II. *J. Biol. Chem.*, 277(9), 6788-98, **2002**.

- Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M and Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiol. Rev.*, 93(1), 327-58, **2013**.
- Vijayalakshmi J, Padmanabhan KP, Mann KG and Tulinsky A. The isomorphous structures of prethrombin2, hirugen-, and PPACK-thrombin: changes accompanying activation and exosite binding to thrombin. *Protein Sci.*, 3(12), 2254-71, **1994**.
- Vijayendran RA and Leckband DE. A quantitative assessment of heterogeneity for surface-immobilized proteins. *Anal. Chem.*, 73(3), 471-80, **2001**.
- Walker FJ and Esmon CT. The effect of prothrombin fragment 2 on the inhibition of thrombin by antithrombin III. *J. Biol. Chem.*, 254(13), 5618-22, **1979**.
- Wang C, Hossain M, Ma L, Ma Z, Hickman JJ and Su M. Highly sensitive thermal detection of thrombin using aptamer-functionalized phase change nanoparticles. *Biosensors Bioelectron.*, 26(2), 437-43, **2012**.
- Wang J, Zhu Z, Munir A and Zhou HS. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles-enhanced SPR sensing for ultrasensitive sandwich bio-assay. *Talanta*, 84(3), 783-8, **2011**.
- Wang KY, McCurdy S, Shea RG, Swaminathan S and Bolton PH. A DNA aptamer which binds to and inhibits thrombin exhibits a new structural motif for DNA. *Biochemistry (Mosc)*. 32(8), 1899-904, **1993**.
- Wang RE, Zhang Y, Cai J, Cai W and Gao T. Aptamer-based fluorescent biosensors. *Curr. Med. Chem.*, 18(27), 4175-84, **2011**.
- Wang X, Zhou J, Yun W, Xiao S, Chang Z, He P and Fang Y. Detection of thrombin using electrogenerated chemiluminescence based on Ru(bpy)<sub>3</sub>(2+)-doped silica nanoparticle aptasensor via target protein-induced strand displacement. *Anal. Chim. Acta*, 598(2), 242-8, **2007**.
- Wang Y and Liu B. Conjugated polyelectrolyte-sensitized fluorescent detection of thrombin in blood serum using aptamer-immobilized silica nanoparticles as the platform. *Langmuir*, 25(21), 12787-93, **2009**.
- Wang Y, Bao L, Liu Z and Pang DW. Aptamer biosensor based on fluorescence resonance energy transfer from upconverting phosphors to carbon nanoparticles for thrombin detection in human plasma. *Anal. Chem.*, 83(21), 8130-37, **2011a**.
- Wang Y, Yuan R, Chai Y, Yuan Y, Bai L and Liao Y. A multi-amplification aptasensor for highly sensitive detection of thrombin based on high-quality hollow CoPt nanoparticles decorated graphene. *Biosens. Bioelectron.*, 30(1), 61-6, **2011b**.
- Watson JD and Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356), 737-8, **1953**.
- Wilkins MH, Stokes AR and Wilson HR. Molecular structure of deoxypentose nucleic acids. *Nature*, 171(4356), 738-40, **1953**.

- 
- Willner I and Zayats M. Electronic aptamer-based sensors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 46(34), 6408-18, **2007**.
- Wolf LK, Gao Y and Georgiadis RM. Kinetic discrimination of sequence-specific DNA-drug binding measured by surface plasmon resonance imaging and comparison to solution-phase measurements. *J. Am. Chem. Soc.*, 129(34), 10503-11, **2007**.
- Wu Q, Tsiang M and Sadler JE. Localization of the single-stranded DNA binding site in the thrombin anion-binding exosite. *J. Biol. Chem.*, 267(34), 24408-12, **1992**.
- Xiao Y, Lubin AA, Heeger AJ and Plaxco KW. Label-free electronic detection of thrombin in blood serum by using an aptamer-based sensor. *Angew Chem Int Edit*, 44(34), 5456-59, **2005**.
- Yang L, Manithody C, Walston TD, Cooper ST and Rezaie AR. Thrombomodulin enhances the reactivity of thrombin with protein C inhibitor by providing both a binding site for the serpin and allosterically modulating the activity of thrombin. *J. Biol. Chem.*, 278(39), 37465-70, **2003**.
- Zhang X and Yadavalli VK. Surface immobilization of DNA aptamers for biosensing and protein interaction analysis. *Biosens. Bioelectron.*, 26(7), 3142-7, **2010**.
- Zhang Z, Wang Z, Wang X and Yang X. Magnetic nanoparticle-linked colorimetric aptasensor for the detection of thrombin. *Sensors Actuators B: Chem.*, 147(2), 428-33, **2010**.
- Zhao J, Zhang Y, Li H, Wen Y, Fan X, Lin F, Tan L and Yao S. Ultrasensitive electrochemical aptasensor for thrombin based on the amplification of aptamer-AuNPs-HRP conjugates. *Biosens. Bioelectron.*, 26(5), 2297-303, **2011**.
- Zhao Q, Lu X, Yuan CG, Li XF and Le XC. Aptamer-linked assay for thrombin using gold nanoparticle amplification and inductively coupled plasma-mass spectrometry detection. *Anal. Chem.*, 81(17), 7484-9, **2009**.
- Zheng D, Zou R and Lou X. Label-free fluorescent detection of ions, proteins, and small molecules using structure-switching aptamers, SYBR Gold, and exonuclease i. *Anal. Chem.*, 84(8), 3554-60, **2012**.
- Zheng J, Feng W, Lin L, Zhang F, Cheng G, He P and Fang Y. A new amplification strategy for ultrasensitive electrochemical aptasensor with network-like thiocyanuric acid/gold nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.*, 23(3), 341-7, **2007**.
- Zheng R, Park BW, Kim DS and Cameron BD. Development of a highly specific amine-terminated aptamer functionalized surface plasmon resonance biosensor for blood protein detection. *Biomed Opt Express*, 2(9), 2731-40, **2011**.
- Zhou G, Huang X and Qu Y. The binding effect of aptamers on thrombin. *Biochem. Eng. J.*, 52(2013), 117-22, **2010**.



Zhou WJ, Halpern AR, Seefeld TH and Corn RM. Near infrared surface plasmon resonance phase imaging and nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance phase imaging for ultrasensitive protein and DNA biosensing with oligonucleotide and aptamer microarrays. *Anal. Chem.*, 84(1), 440-5, **2011**.

# ANNEXE A. MATERIEL EXPERIMENTAL

## Réactifs chimiques

CH<sub>3</sub>O-PEG-SH provient de Rapp Polymere GmbH (Germany).

Succinimidyl-6-(biotinamido)-6-hexanamido hexanoate (NHS-biotine) provient de Thermo Fisher Scientific (USA).

11-Mercapto-Undecane-1 NHS est synthétisé au laboratoire (Milgram 2012).

[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP provient de Perkin-Elmer (France).

La polynucléotide kinase T4 provient de New England Biolabs (UK).

Le reste des réactifs chimiques provient de Sigma-Aldrich (France).

## Oligonucléotides

Les oligonucléotides ont tous été commandés chez Eurogentec (France). Ils comportent tous une modification amine primaire en 5' nécessaire à leur fonctionnalisation ultérieure par un groupe pyrrole ou thiol (pour les sondes à greffer sur la surface) ou une molécule de biotine (pour l'amplification du signal).

| Nom   | Séquence   |
|-------|--|
| APT1  | 5'-NH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> -(T <sub>10</sub> )-GGT-TGG-TGT-GGT-TGG-3'                    |
| APT2  | 5'-NH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> -(T <sub>10</sub> )-AGT-CCG-TGG-TAG-GGC-AGG-TTG-GGG-TGA-CT-3' |
| APT1c | 5'-NH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> -(T <sub>10</sub> )-CCA-ACC-ACA-CCA-ACC-3'                    |
| APT2c | 5'-NH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> -(T <sub>10</sub> )-AGT-CAC-CCC-AAC-CTG-CCC-TAC-CAC-GCA-CT-3' |
| Zip7  | 5'-NH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> -(T <sub>10</sub> )-TGC-GAT-CGC-AGC-GGT-AAC-CTG-ACC-3'        |
| Zip9  | 5'-NH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> -(T <sub>10</sub> )-GAC-CAT-CGT-GCG-GGT-AGG-TAG-ACC-3'        |

**Tableau A. 1** Séquence des oligonucléotides apparaissant dans ce manuscrit.

## Protéines

| Nom                               | Concentration typique | Fournisseur            |
|-----------------------------------|-----------------------|------------------------|
| thrombine (THR)                   | 100 pM – 100 nM       | Cryopep (France)       |
| prothrombine (proTHR)             | 50 – 100 nM           | Cryopep (France)       |
| facteur Va (FVa)                  | 60 pM – 30 nM         | Cryopep (France)       |
| facteur Xa (FXa)                  | 25 pM – 25 nM         | Cryopep (France)       |
| antithrombine III (ATIII)         | 50 – 100 nM           | Cryopep (France)       |
| cofacteur II de l'héparine (HCII) | 50 – 100 nM           | Cryopep (France)       |
| cytochrome c (cyt c)              | 500 nM                | Sigma-Aldrich (France) |
| Albumine sérique bovine (BSA)     | 500 nM                | Sigma-Aldrich (France) |
| streptavidine (SA)                | 50 – 500 nM           | Sigma-Aldrich (France) |

**Tableau A. 2** Liste des protéines utilisées dans ce manuscrit.

## Tampons

Les tampons et solutions utilisés pour la SPRi sont préparés au laboratoire avec de l'eau déionisée (18,2 MΩ.cm), purifiés avec un filtre 0,22 µm et conservés à -20°C.

| Nom et fonction                                   | Composition  |
|---|--|
| tampon de course                                  | Tris-HCl 20 mM, MgCl <sub>2</sub> 1 mM, NaCl 120 mM, KCl 10 mM, pH 7,4   |
| tampon de course calcium                          | Tris-HCl 20 mM, MgCl <sub>2</sub> 1 mM, NaCl 120 mM, KCl 10 mM, CaCl <sub>2</sub> 2 mM, pH 7,4                                   |
| tampon de greffage thiol                          | HK <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1M pH 9,25   |
| tampon de greffage ppy (GDALi)                    | LiClO <sub>4</sub> 100 mM, glycérol 1% (v/v), acétonitrile 30% (v/v), DMSO 20% (v/v)   |
| tampon de couplage                                | PBS pH 8 (ou NaHCO <sub>3</sub> 0,5 M pH 8)  |
| tampon d'hybridation (expérience <sup>32</sup> P) | NaCl 537 mM, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 mM, KCl 2,7 mM, Tween20 0,1%, Denhart 50x 2%, Salmon DNA (10 mg/mL) 0,1%, pH 7,4 |
| solution de régénération NaCl                     | NaCl 1 M   |
| solution de régénération NaOH                     | NaOH 50 mM   |
| solution de blocage                               | BSA 500 nM et cyt c 500 nM dilués dans le tampon de course   |

**Tableau A. 3** Liste des solutions utilisées dans ce manuscrit.

## Matériel

| Nom  | Fournisseur                         |
|--|-------------------------------------|
| prisme de verre haut indice (angle 60°) recouvert d'une double couche métallique : titane 5 nm et or 45 nm d'épaisseur | Horiba Scientific-GenOptics, France |
| colonne NAP <sup>TM</sup> 5, Sephadex <sup>TM</sup> G-25   | GE Healthcare, UK                   |
| spectrophotomètre ND-1000 Nanodrop   | Labtech International, UK           |
| robot piézoélectrique de dispense de nanovolumes sans contact  | Siliflow, France                    |
| générateur de plasma Femto   | Diener Electronic, Allemagne        |
| imageur SPR SPRi-Lab+  | Horiba Scientific-GenOptics, France |
| dégazeur   | Alltech, France                     |
| pompe seringue Cavro   | Tecan, USA                          |

**Tableau A. 4** Liste du matériel utilisé dans ce manuscrit.

# ANNEXE B. PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

## *Fonctionnalisation des oligonucléotides (pyrrole, thiol, biotine)*

Les oligonucléotides (**Tableau A. 1**) sont couplés à des molécules Py-NHS, thiol-NHS ou biotine-NHS *via* un protocole inspiré de (Grosjean 2005). La molécule de couplage (Py-NHS, thiol-NHS ou biotine-NHS) est ajoutée en large excès (ratio 80:1) à une solution PBS pH 8 (ou  $\text{NaHCO}_3$  0,5 M pH 8) contenant 4 nmoles d'oligonucléotides (comportant une modification amine primaire en 5') dans un volume final de 200  $\mu\text{L}$ . La réaction est maintenue pendant 60 min minimum à température ambiante avant que le produit conjugué ne soit purifié sur une colonne NAP<sup>TM</sup> 5 (GE Healthcare, UK) par élution avec de l'eau déionisée. Après lyophilisation, les oligonucléotides sont resuspendus dans l'eau déionisée ou le tampon de greffage et la concentration est déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm (spectrophotomètre ND-1000 Nanodrop, Labtech International, UK).

## *Fabrication des biopuces à aptamères par électropolymérisation du pyrrole*

Les biopuces à aptamère sont élaborées sur des prismes de verre haut indice recouverts d'une nanocouche d'or. Avant toute fonctionnalisation, les surfaces sont nettoyées afin de désorber toute impureté éventuellement adsorbée sur l'or, dans une solution « piranha » (mélange 2:1  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$  : attention la réaction du mélange est exothermique et la solution est hautement réactive, elle doit être préparée dans des conditions de sécurité appropriées). Une méthode alternative de nettoyage fut utilisée pour la réalisation des dernières biopuces pyrrole, et pour celle de toutes les biopuces thiol. Elle consiste en un traitement plasma (0,6 mbar, 75 % Oxygène, 25 % Argon, puissance 40 W, 6 min) effectué dans un générateur de plasma Femto (Diener Electronic, Allemagne) la veille de la fonctionnalisation des puces. Les surfaces d'or propres sont ensuite immergées ~30 min dans une solution d'1-dodécane-thiol 20 mM (dans de l'éthanol 99,9 %) à température ambiante. De cette manière, une couche auto-assemblée hydrophobe est systématiquement formée dans le but d'éviter l'étalement ultérieur des plots et d'empêcher toute contamination inter-plots lors du greffage des sondes. Après la formation de cette couche, les biopuces sont extensivement rincées à l'éthanol (96,2 %) et à l'eau déionisée (18,2 M $\Omega$ .cm), séchées sous flux d'argon et prêtes à être fonctionnalisées avec les oligonucléotides sondes (**Tableau A. 1**). Les solutions de greffage, contenant les oligonucléotides modifiés avec un groupe terminal pyrrole en 5', sont préparées dans un tampon de greffage GDALi (**Tableau A. 3**). Chaque solution correspond à une unique espèce de plot, généralement répliquée en 3 exemplaires sur la surface, et contient 20 mM de pyrrole et 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  ou 20  $\mu\text{M}$  d'oligonucléotides

modifiés. La copolymérisation localisée des espèces en solution sur la surface des biopuces est assurée par une cellule électrochimique mobile non commerciale fabriquée au laboratoire, déjà décrite précédemment (Livache 1994; Guedon 2000). Celle-ci consiste principalement en un cône de pipette (10 ou 200  $\mu\text{L}$ ) de diamètre d'ouverture compris entre 500 et 1000  $\mu\text{m}$  (ajusté par la découpe du cône) chargé successivement avec les solutions de greffage après un premier équilibrage dans une solution de pyrrole 20 mM. La contre électrode (fil de platine inséré dans le cône) et l'électrode de travail (surface d'or de la biopuce) sont connectées à un potentiostat (SP-200, Bio-Logic Science Instruments ou PGSTAT 30, Autolab). Le cône est chargé avec la solution de greffage et déplacé sur la surface à l'aide d'un moteur ESP300 (Newport, France). Les plots polypyrrole sont alors réalisés par une impulsion électrique de 100 ms (différence de potentiel 2V, gamme de courant 100  $\mu\text{A}$ ). La charge enregistrée durant le dépôt ( $\sim 2\text{-}4$   $\mu\text{C}$ ) atteste de l'épaisseur nanométrique du film polypyrrole greffé sur la surface, cruciale pour une détection SPRi (Guedon 2000). Ce processus est répété pour chaque nouveau plot, entre deux lavages du cône dans une solution de pyrrole 20 mM limitant les risques de contaminations entre les différentes solutions de greffage.

Dès que la matrice de plots est complète, la biopuce est retirée du dispositif de greffage et à nouveau rincée abondamment à l'eau déionisée avant d'être séchée sous flux d'argon et stockée à 4°C. Les biopuces sont en général utilisées en SPRi dans les jours suivants mais montrent également de bonnes performances d'hybridation et de détection de la thrombine après plusieurs mois de stockage dans ces conditions.

Avant une première utilisation, une étape de blocage, visant à limiter le signal non spécifique, est réalisée par immersion de la biopuce dans une solution de blocage (**Tableau A. 3**) pendant 1h30 à température ambiante.

#### *Fabrication des biopuces à aptamères par formation de SAMs thiol*

Différents paramètres furent testés (certains discutés au paragraphe 2.2 du manuscrit) au cours de la mise au point de ce protocole. Le protocole présenté ici correspond au protocole optimisé utilisé lors de l'élaboration de toutes les biopuces dont les résultats pour la détection de la thrombine sont présentés dans ce manuscrit.

Les biopuces à aptamères élaborées par chimie thiol (formation de SAMs mixtes) sont toutes nettoyées par un traitement plasma (0,6 mbar, 75 % Oxygène, 25 % Argon, puissance 40 W, 6 min) dans un générateur de plasma Femto (Diener Electronic, Allemagne) la veille de leur fonctionnalisation. Juste après le traitement, la surface est jugée trop « réactive » et les biopuces réalisées directement à la suite du traitement ont montré une baisse des performances de détection de la thrombine comparées à celles des biopuces réalisées le lendemain.

Le lendemain, les surfaces sont à nouveau rapidement nettoyées à l'eau déionisée et l'éthanol (96,2 %) avant d'être séchées sous flux d'argon et positionnées dans un dispositif de greffage robotisé par dispense de nanovolumes sans contact (Siliflow, France).

Les solutions de greffage, contenant les oligonucléotides modifiés avec un groupe terminal thiol en 5', sont préparées dans un tampon de greffage  $\text{HK}_2\text{PO}_4$  (**Tableau A. 3**). Chaque

---

solution correspond à une unique espèce de plot, généralement répliquée en 3 ou 4 exemplaires sur la surface, et contient 10  $\mu\text{M}$  de PEG modifiés ( $\text{CH}_3\text{O-PEG-SH}$ ) et 10  $\mu\text{M}$  ou 20  $\mu\text{M}$  d'oligonucléotides modifiés. Le greffage est réalisé dans une enceinte à l'humidité contrôlée ( $\sim 80\text{-}85\%$  d'humidité) par l'éjection de gouttes ( $\sim 4\text{ nL}$ ) de la solution de greffage sur la surface (taille des gouttes  $\sim 500\text{ }\mu\text{m}$ , espacées tous les 1,25 mm). L'éjecteur est nettoyé à l'eau déionisée entre chaque chargement de solution de greffage de façon à limiter les risques de contamination entre les différentes solutions. Lorsque la matrice de plots est complète, la biopuce est encore laissée dans l'enceinte humide pendant 30 min afin d'assurer la bonne formation des SAMs, puis retirée et placée à sécher sous sorbonne pour la nuit.

Le lendemain, les biopuces sont rincées abondamment à l'eau déionisée avant d'être séchées sous flux d'argon et stockées à  $4^\circ\text{C}$ . Les biopuces sont en général utilisées en SPRi dans les jours suivant mais montrent également des performances exploitables d'hybridation et de détection de la thrombine après plusieurs semaines de stockage dans ces conditions.

Avant une première utilisation, une étape de blocage, visant à limiter le signal non spécifique, est réalisée par immersion de la biopuce dans une solution de blocage (**Tableau A. 3**) pendant 1h30 à température ambiante.

#### *Détermination de la densité de greffage par radio-marquage*

Les expériences de radio-marquage furent toutes réalisées en étroite collaboration avec Didier Gasparutto, au laboratoire LAN (Lésion des Acides Nucléiques) du SCIB (Service de Chimie Inorganique et Biologique) au CEA Grenoble.

La séquence utilisée pour la détermination de la densité de greffage par radio-marquage (APT1) comporte une modification amine primaire en 5' légèrement différente des autres séquences utilisées pour la SPRi : la modification est réalisée sur la base thymine du nucléotide terminal en 5' (modification *amino modifier C6 dT*) au lieu du groupe phosphate du nucléotide terminal (modification 5' *amino modifier C6*). Cette modification est apportée afin de permettre le marquage  $^{32}\text{P}$  enzymatique de la sonde par une kinase. La longueur de l'espaceur C6 entre l'amine et l'oligonucléotide étant identique dans les deux cas, et encore augmentée de la même façon par le couplage avec la molécule thiol-NHS, l'influence de cette modification est probablement négligeable dans la densité de greffage obtenue.

Une fois couplés avec le groupe thiol nécessaire à leur greffage ultérieur, les oligonucléotides (100 pmol) sont marqués en 5' avec 10  $\mu\text{Ci}$  [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ]ATP (2 pmol, 10 mCi/mL) sous l'action de la polynucleotide kinase T4 : incubation avec 10 unités de l'enzyme, dans 30  $\mu\text{L}$  du tampon fourni par avec l'enzyme pendant 30 min, à  $37^\circ\text{C}$ . La réaction est stoppée par l'ajout d'1  $\mu\text{L}$  d'une solution d'EDTA 0,5 M pH 8. Les oligonucléotides marqués sont ensuite purifiés sur une colonne MicroSpin (Pharmacia, Suisse).

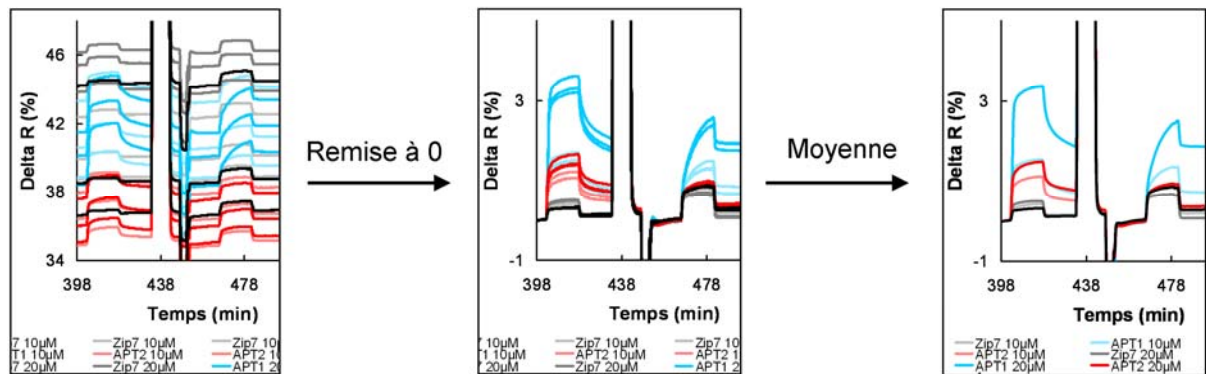
Les sondes radio-marquées sont greffées sur des lames de verre dorées ( $7 \times 11\text{ mm}^2$ ). 10  $\mu\text{L}$  de la solution de greffage (tampon  $\text{HK}_2\text{PO}_4$  contenant un mélange de 16 pmol d'oligonucléotides marqués au  $^{32}\text{P}$  et d'oligonucléotides non marqués pour une concentration finale en aptamère variant entre 0,1 et 30  $\mu\text{M}$  et 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{CH}_3\text{O-PEG-SH}$ ) sont déposés sur les lames et recouverts avec une lamelle de verre. Chaque solution de greffage est utilisée sur

3 lames différentes. La mesure de radioactivité est effectuée une première fois sur toutes les lames avec un compteur de radioactivité MIP-10 (Nardeux-Loche, France) juste après le dépôt. Les lames sont ensuite laissées dans un endroit humide pour la nuit. Le lendemain, les lames sont rincées 3 fois à l'eau déionisée avant que la mesure de radioactivité soit à nouveau mesurée pour chaque lame. Le rapport entre les deux mesures de radioactivité réalisées permet de calculer le nombre de sondes effectivement greffées à la surface et ainsi de déterminer la densité de greffage par unité de surface.

## ANNEXE C. TRAITEMENT DES DONNEES

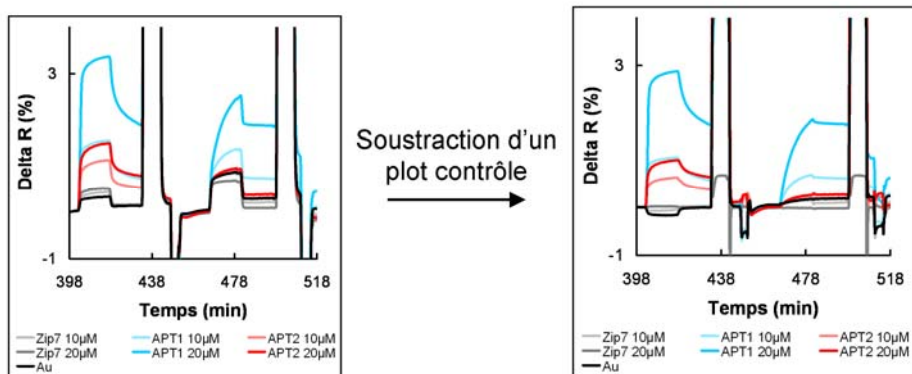
Les données SPRi sont acquises *via* le logiciel distribué par le fournisseur Horiba Scientific-GenOptics (SPRiViewIt). Ce logiciel permet de suivre les changements de réflectivité de chaque plot de la biopuce au cours d'une expérience SPRi. Les plots sont préalablement sélectionnés sur la surface par la définition des zones d'intérêt (masques). Le signal de réflectivité (R) est normalisé par la luminosité détectée en absence de plasmon (mode transverse électrique TE) et exprimé en %. Les images de la biopuce sont transmises par une caméra CCD 16 bit et les valeurs de réflectivité de chaque plot tracées en fonction du temps durant tout le temps de l'expérience (courbes cinétiques).

En fin d'expérience, les données brutes sont pré-traitées afin d'améliorer la lisibilité des signaux et faciliter leur interprétation. Une partie de ce traitement est réalisée par le lancement de macros Excel développées au cours de ce travail de thèse dans le but d'automatiser et d'accélérer cette étape. Premièrement, le débit d'acquisition étant trop rapide pour le besoin des expériences présentées ici (38 valeurs par minute), les données sont moyennées toutes les 10 valeurs afin de réduire la taille des fichiers traités. Ensuite, tous les signaux (généralement autour de 35-45 % de R au début de l'expérience) sont remis à 0 avant la première injection d'intérêt réalisée, en soustrayant la valeur de réflectivité enregistrée à ce moment sur chaque plot. De plus, les signaux sont souvent présentés sous forme de moyenne des signaux obtenus sur les répliquats présents sur la biopuce afin de ne pas surcharger les figures.



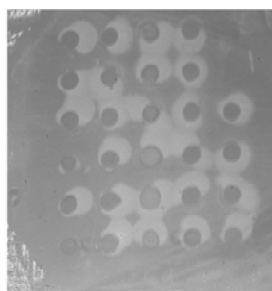
Finalement, une correction des signaux par un signal de référence choisi sur un plot contrôle (Zip7 ou Zip9) est éventuellement réalisée. Cette dernière étape est particulièrement utile lorsque les indices de réfraction des solutions injectées sont sensiblement différents du tampon de course pur et provoquent ainsi un saut d'indice plus ou moins important sur tous les plots et variable d'une injection à l'autre. Afin de pouvoir comparer les différences de réflectivité enregistrées entre différente injection, il est indispensable de réaliser cette étape. De plus, elle peut également permettre d'éliminer a posteriori le signal non spécifique.



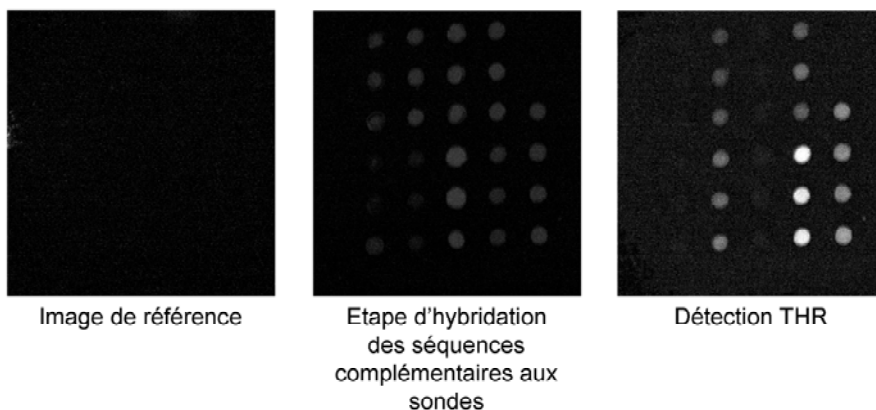


Simultanément à l'acquisition des valeurs de réflectivité, le logiciel permet également d'afficher et d'enregistrer les images transmises par la caméra CCD. Cet outil est dans notre cas particulièrement intéressant au cours de l'expérience, grâce à la possibilité qu'il offre de réaliser des images différentielles. Ces images différentielles sont obtenues en soustrayant une image de référence, sélectionnée avant le début d'une injection, aux images transmises en temps réel par la caméra. Il est donc très facile d'observer et d'identifier d'un seul coup d'œil les plots où est détectée une interaction spécifique entre les sondes greffées à leur surface et l'analyte présent en solution.

Image brute enregistrée par SPRi



Images différentielles observées durant une expérience

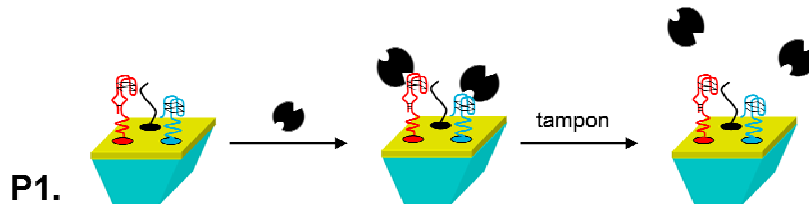


# ANNEXE D. FORMATION DU COMPLEXE « SANDWICH »

Protocoles détaillés et illustrés des injections réalisées au chapitre 3 pour la formation du complexe « sandwich », numérotés de P1 à P9.

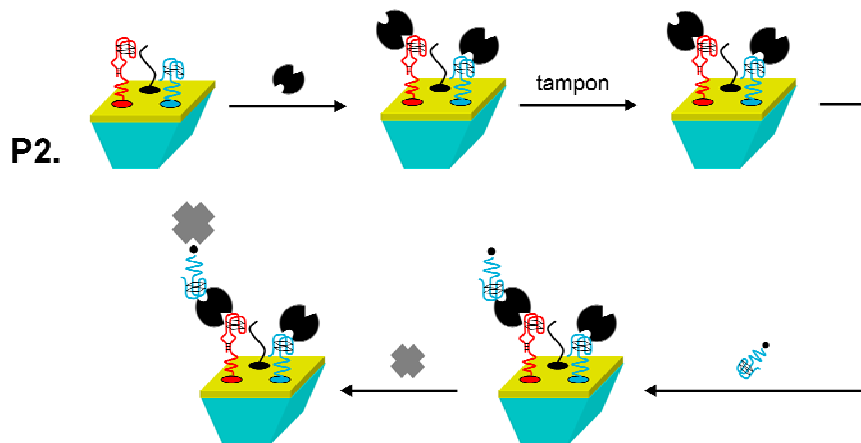


## Protocole P1



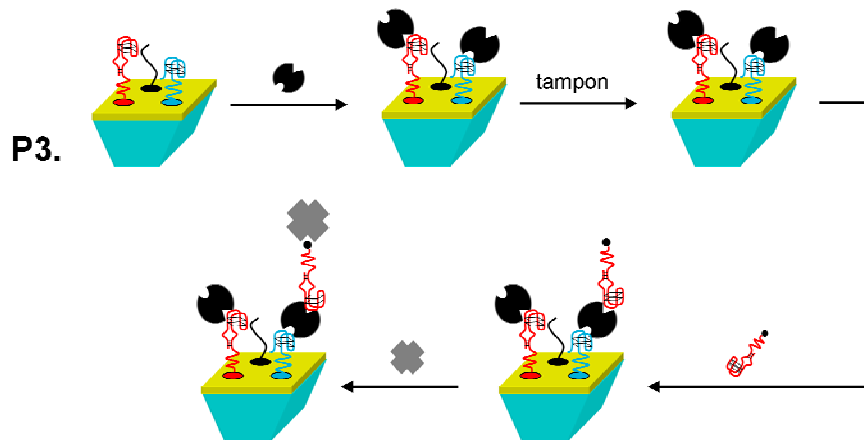
- t = 0 min      injection thrombine 50 nM, mode « va et vient » activé
- t = 30 min    passage du tampon de course
- t = 70 min    régénération : injection NaCl 1 M
- t = 80 min    régénération : injection NaOH 50mM

## Protocole P2



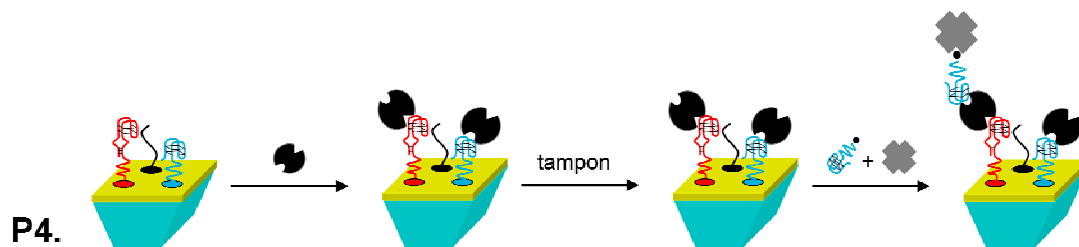
- t = 100 min    injection thrombine 50 nM, mode « va et vient » activé
- t = 130 min    passage du tampon de course
- t = 138 min    injection APT1 biotinylé 100 nM, mode « va et vient » activé
- t = 170 min    injection streptavidine 50 nM
- t = 180 min    régénération : injection NaCl 1 M
- t = 200 min    régénération : injection NaOH 50mM

### Protocole P3



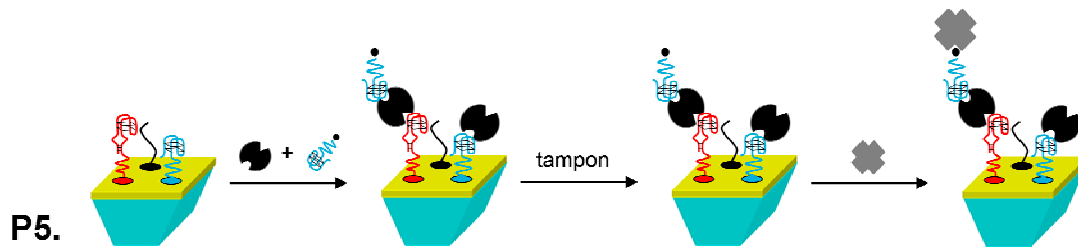
- t = 210 min injection thrombine 50 nM, mode « va et vient » activé
- t = 240 min passage du tampon de course
- t = 248 min injection APT2 biotinylé 100 nM
- t = 258 min passage du tampon de course
- t = 270 min injection streptavidine 50 nM
- t = 280 min régénération : injection NaCl 1 M
- t = 300 min régénération : injection NaOH 50mM

### Protocole P4



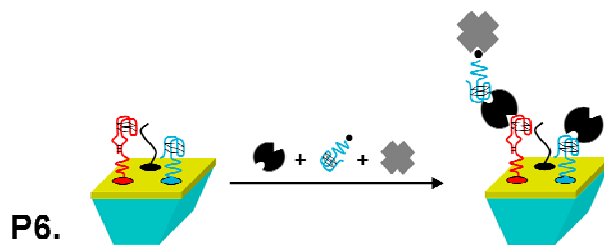
- t = 0 min injection thrombine 50 nM, mode « va et vient » activé
- t = 30 min passage du tampon de course
- t = 38 min co-injection APT1 biotinylé 100 nM + streptavidine 500 nM, mode « va et vient » activé
- t = 70 min passage du tampon de course
- t = 80 min régénération : injection NaCl 1 M

## Protocole P5



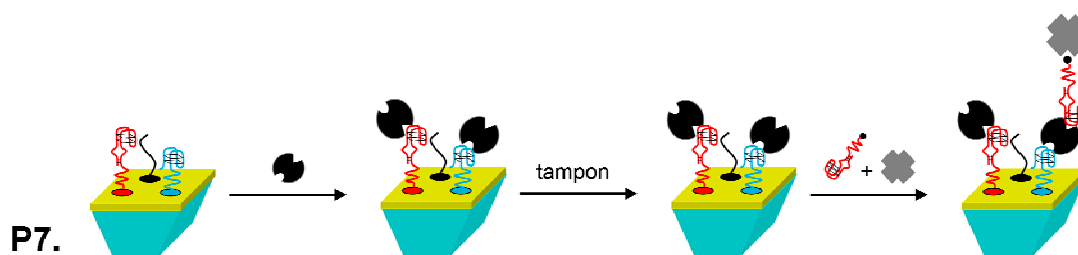
- t = 100 min co-injection thrombine 50 nM + APT1 biotinylé 100 nM, mode « va et vient » activé  
 t = 130 min passage du tampon de course  
 t = 180 min injection streptavidine 50 nM  
 t = 190 min régénération : injection NaCl 1 M

## Protocole P6



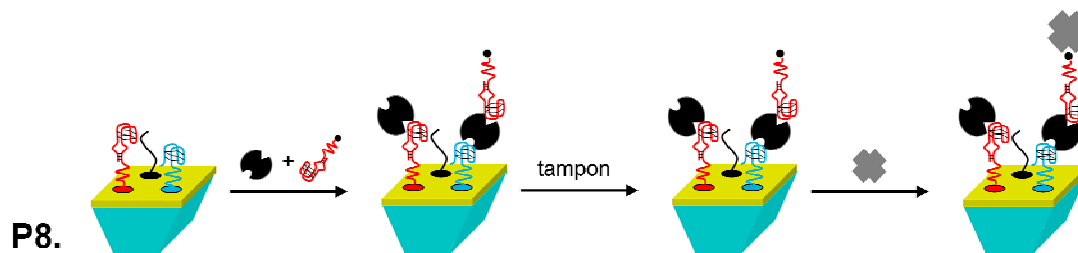
- t = 210 min co-injection thrombine 50 nM + APT1 biotinylé 100 nM + streptavidine 500 nM, mode « va et vient » activé  
 t = 240 min passage du tampon de course  
 t = 290 min régénération : injection NaCl 1 M  
 t = 300 min régénération : injection NaOH 50mM

## Protocole P7



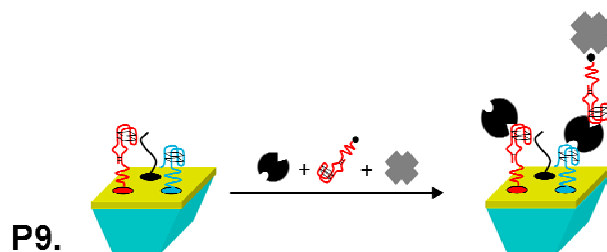
- t = 0 min injection thrombine 50 nM, mode « va et vient » activé  
 t = 30 min passage du tampon de course  
 t = 38 min co-injection APT2 biotinylé 100 nM + streptavidine 500 nM, mode « va et vient » activé  
 t = 70 min passage du tampon de course  
 t = 100 min régénération : injection NaCl 1 M  
 t = 120 min régénération : injection NaOH 50mM

## Protocole P8



- t = 140 min co-injection thrombine 50 nM + APT2 biotinylé 100 nM, mode « va et vient » activé
- t = 170 min passage du tampon de course
- t = 172 min injection streptavidine 50 nM, mode « va et vient » activé
- t = 202 min passage du tampon de course
- t = 220 min régénération : injection NaCl 1 M

## Protocole P9



- t = 240 min co-injection thrombine 50 nM + APT1 biotinylé 100 nM + streptavidine 500 nM, mode « va et vient » activé
- t = 270 min passage du tampon de course
- t = 300 min régénération : injection NaCl 1 M
- t = 310 min régénération : injection NaOH 50mM